



Recherche et caractérisation par dynamique moléculaire d'états intermédiaires pour la complexation entre la protéine FKBP12 et des ligands de haute affinité

Lilian Olivieri

► To cite this version:

Lilian Olivieri. Recherche et caractérisation par dynamique moléculaire d'états intermédiaires pour la complexation entre la protéine FKBP12 et des ligands de haute affinité. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de la Réunion, 2012. Français. <NNT : 2012LARE0011>. <tel-01189007>

HAL Id: tel-01189007

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01189007>

Submitted on 1 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire (Université de la Réunion)
Dynamique des Systèmes et Interactions des Macromolécules Biologiques
(INSERM UMR-S 665, Université Paris Diderot - Paris 7, Institut National de la Transfusion Sanguine)

Thèse de l'Université de la Réunion

Ecole Doctorale Interdisciplinaire

Présentée par

M. OLIVIERI Lilian

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université de la Réunion

Spécialité : Biologie Informatique

**Recherche et caractérisation par dynamique
moléculaire d'états intermédiaires pour la
complexation entre la protéine FKBP12 et des
ligands de haute affinité**

Soutenue publiquement le 4 juillet 2012, devant le jury composé de :

Mme Thérèse MALLIAVIN, Chargée de recherche H.D.R.
Unité de Bioinformatique Structurale, CNRS - Institut Pasteur

Rapporteur

M. Roland STOTE, Chargé de recherche H.D.R.
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CNRS - INSERM

Rapporteur

M. Jean-Yves LE QUESTEL, Professeur
Chimie Interdisciplinarité, synthèse, analyse, modélisation (CEISAM), CNRS - Université de Nantes

Examineur

M. Gérard VERGOTEN, Professeur
Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), CNRS - Université de Lille 1

Président

M. Bernard OFFMANN, Professeur
Unité de Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines (UFIP), CNRS - Université de Nantes

Directeur

M. Fabrice GARDEBIEN, Maître de Conférences
Dynamique des Systèmes et Interactions des Macromolécules Biologiques (DSIMB), INSERM -
Université de la Réunion

Co-directeur

*À la mémoire de mon parain pour qui j'ai tenu à faire de la recherche dans le domaine de la
santé,*

*À la mémoire de mes grands-parents maternels et de ma grand-mère paternelle, vous avez vu
le début de ma thèse, j'aurais aimé que vous soyez toujours là pour célébrer la fin,*

À ma famille,

À ma conjointe,

À mes ami(e)s,

À la promotion 2003 Alpha et à la chasse b...l,

*À tous les étudiant(e)s à qui j'ai eu le plaisir d'enseigner (certains se considéreront chanceux
d'autres moins) et qui m'ont beaucoup appris sur moi-même,*

À vous chères lectrices et chers lecteurs sans qui ce manuscrit n'aurait aucune utilité,

*À tous les terribles guerriers du Pilou-Pilou qui descendent de la montagne vers la mer avec
leurs femmes échevelées allaitant leurs enfants à l'ombre des grands cocotiers blancs,*

À tous les enfants du Vieux Port,

À jamais les premiers.

Remerciements

Je souhaite remercier les membres du jury de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail. Je les remercie pour leurs commentaires qui vont me permettre d'encore m'améliorer. Plus particulièrement, merci à Mme Malliavin et M. Le Questel qui m'ont fourni des notes m'aidant ainsi à préciser quelques détails qui peuvent conduire à une meilleure compréhension des futures lectrices et des futurs lecteurs. Je suis ravi que mon travail ait pu être jugé par des personnes dont les expériences sont aussi riches et variées apportant le regard pluridisciplinaire que je désirais sur mon travail. Cela a été un grand plaisir de vous rencontrer, j'espère avoir la chance dans l'avenir de vous revoir et peut-être de développer des collaborations afin de profiter de vos connaissances et de vos expériences.

Je voudrais également remercier mes deux directeurs Fabrice Gardebien et Bernard Offmann de m'avoir permis d'effectuer une thèse de doctorat sur ce sujet passionnant. Un grand merci à Fabrice de m'avoir encadré depuis mon stage de 2^{ème} année de Master jusqu'à la fin de ma thèse. Malgré certaines divergences d'esprit, je te remercie de m'avoir montré ce que rigueur scientifique et recherche d'excellence veulent réellement dire. Merci finalement de m'avoir poussé à toujours m'améliorer. Merci à toi Bernard pour les discussions très intéressantes que nous avons pu avoir sur tes autres projets et sur divers sujets. Nos quelques discussions scientifiques me font espérer que nous aurons un jour la possibilité de développer un projet commun.

Merci aux anciens membres de l'EBGM (que j'ai eu le plaisir de retrouver dans le laboratoire DSIMB pour certains) qui m'ont formé en bioinformatique durant mon cursus universitaire et m'ont apporté leur aide. Merci aux membres de DSIMB qui m'ont aidé durant ma thèse et qui ont participé aux derniers préparatifs à ma soutenance.

Merci aux anciens membres du LBGM qui m'ont accueilli et guidé durant mon stage de 2^{ème} année de Master et au début de ma thèse.

"Merci" to Shandu, Malini and Magali with whom I enjoyed sharing the office. I wish our roads will cross again soon. I would also like to thank Srinu and Mini for their kindness and their encouragement. I hope to see you soon in India.

Merci également aux nombreux personnels de l'université que j'ai rencontré durant ces années, merci à toutes les secrétaires, aux gestionnaires des emplois du temps, de saisies des notes, aux personnes du centre de calcul, du BRED et de l'EDI. Merci aussi aux personnes de l'entretien et aux gardiens.

Merci aux élus doctorants au CS de la liste LADI avec qui j'ai apprécié prendre part aux débats sur la politique scientifique de l'Université de la Réunion (quelques fois enflammés entre certains de ses dirigeants) et avec qui j'ai tenté de défendre au mieux les doctorants.

REMERCIEMENTS

Merci à l'association ADDR avec laquelle j'ai pu participé à des projets enrichissants tels que le forum des jeunes chercheurs, la revue de la recherche, exposciences ou la fête de la science.

Merci à ma promotion de moniteurs et à l'ensemble des doctorants ayant participé aux Doctoriales 2009 d'avoir chacun beaucoup apporté à nos formations et d'avoir ouvert une fenêtre sur vos univers que je ne connaissais pas toujours.

Je voudrais également remercier les participants et les organisateurs de la conférence MIB 2009 de m'avoir montré que rigueur scientifique pouvait rimer avec bonne humeur et joie de vivre. Grâce à toutes ces personnes, je me souviendrai toujours de ma première conférence internationale (notamment, je ne pense pas revoir de si tôt un organisateur de conférence internationale en cote de mailles).

Élise et Manon, merci pour tout ce que vous m'avez apporté, je suis heureux de vous avoir rencontrées et de vous avoir comme amie. Je dois dire que si j'en suis arrivé là c'est aussi un peu grâce à vous.

Merci à mes ami(e)s du collège et du lycée, surtout à Cora, Thibo, Mathieu, Élodie et à ceux que j'ai un petit peu perdu de vue (Christoune, Rémy, Gaël, ...). Merci d'avoir été là dans des moments importants de ma vie.

Merci à mes ami(e)s de fac, ceux que j'ai croisé à l'UTV et ceux qui m'ont fait apprécier d'être à Paris 7. Merci à Gary (spéciale dédicace : "it's a song to say what ?"), Tif, Thiago et Lory qui nous a rejoint en cours de route. Sans vous, Paris n'aurait pas été magique.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont accueilli à la Réunion et m'ont fait découvrir cette magnifique île, ses habitants ainsi qu'une partie de la culture réunionnaise. Merci à ceux qui m'ont permis d'apprécier encore plus d'avoir eu la chance d'effectuer mon doctorat à la Réunion. Merci à Dan (spéciale dédicace : "974 represents"), Eve, Sam, Alexandrine ("mon amie d'enfance"), Gé, Romain, Val ("Allez !!!" ; merci pour ces nombreux moments à la cafét' qui étaient de véritables bouffées d'oxygène), "le clan des poupettes" (Manue, Karine, Flavie), la famille Hoarau (Meuh, Anne-Cé, Julien, ...), Tony, Picci, la famille Sébastien (Olivier, Nicolas, Didier, Véronique), Gilles, Nahouda, Clara, Njara ("Bip bip"), Ulrich, Zarah, Gwladys, Fabienne, "le gang de la cafét'" (Pain choc', Cédric, ...), *etc.* J'en ai probablement oublié quelques uns, j'espère que vous ne m'en tiendrez pas rigueur car, même si vous n'êtes pas cité aujourd'hui, je pense quand même à vous de temps à autre.

Je souhaite par dessus tout remercier ma famille, plus précisément mes parents. Merci de m'avoir donné la possibilité de faire ce que je voulais et de vous être intéressés à mes projets même si vous n'avez pas toujours tout compris. Merci à ma sœur d'être au moins aussi fada que moi et d'arriver à me faire toujours autant rire. Merci à belle-maman qui m'a soutenu par ses bons petits plats.

Je tiens tout particulièrement à remercier Natasha qui égaye ma vie depuis maintenant plus de deux ans et demi. Je te remercie d'être à mes côtés, de m'apporter tant de choses, de partager mes envies et d'accepter de me suivre dans mes délires.

Enfin, je tiens à vous remercier, chères lectrices, chers lecteurs, de votre intérêt pour ce manuscrit. J'espère que vous prendrez du plaisir à le lire et je souhaite qu'il vous apporte tout ce que vous vouliez y trouver.

It has long been an axiom of mine that the little things are infinitely the most important.

Sir Arthur Conan Doyle – A Case of Identity

Table des matières

1	Introduction	1
2	Méthodologie	13
1.	Simulation de dynamique moléculaire	13
1.1.	Les champs de force	13
1.2.	Méthodes de simulation de dynamique moléculaire	18
1.2.1.	Simulations de dynamique moléculaire Langevin, LD	19
1.2.2.	Simulations de dynamique moléculaire aux limites stochastiques ou <i>Stochastic Boundary Molecular Dynamics</i> , SBD	21
1.2.3.	Simulations de dynamique moléculaire modifiées par ajout d'une force ou <i>Biased Molecular Dynamics</i> , BMD	22
2.	Calculs de chimie quantique	23
3	Paramétrisation du champ de force CHARMM22	24
1.	Procédure générale de paramétrisation du champ de force CHARMM22	25
1.1.	Procédure d'optimisation des nouveaux paramètres pour CHARMM22	29

1.1.1.	Optimisation des paramètres de $E_{\text{interactions non-liées}}$	29
1.1.2.	Optimisation des paramètres de $E_{\text{interactions liées}}$	32
2.	Paramétrisation du champ de force CHARMM22 pour les ligands 8 et 308	35
2.1.	Recherche des paramètres à déterminer pour les ligands 8 et 308	35
2.1.1.	Paramètres pour $E_{\text{van der Waals}}$	37
2.1.2.	Paramètres pour $E_{\text{électrostatiques}}$	40
2.1.3.	Paramètres pour $E_{\text{liaisons covalentes}}$	41
2.1.4.	Paramètres pour $E_{\text{angles de valence}}$ et $E_{\text{Urey-Bradley}}$	42
2.1.5.	Paramètres pour $E_{\text{angles dièdres}}$ et $E_{\text{angles dièdres impropres}}$	44
2.1.6.	Résumé des nouveaux paramètres déterminés pour les deux ligands	45
2.2.	Découpage des ligands en molécules modèles	46
2.3.	Initialisation des paramètres à optimiser	48
2.4.	Optimisation des nouveaux paramètres	49
2.4.1.	Charges partielles atomiques optimisées	49
2.4.2.	Paramètres optimisés pour les angles de valence	54
2.4.3.	Paramètres optimisés pour les angles dièdres	55
3.	Validation de la paramétrisation	60
4.	Les états complexés FKBP12-8 et FKBP12-308	73
1.	Procédure de simulation des états complexés EC1 et EC2	74
1.1.	Préparations des structures initiales SI1 et SI2	75
1.2.	Simulations des états complexés EC1 et EC2	79
1.2.1.	Simulations LD	79

1.2.2.	Simulations SBD	82
2.	Analyse des états complexés	86
2.1.	Analyse des structures de FKBP12 et du ligand dans EC1 et EC2	87
2.1.1.	RMSD	87
2.1.2.	Analyse des structures secondaires de FKBP12	92
2.1.3.	Analyse des fluctuations des atomes de FKBP12 et du ligand dans EC1 et EC2	98
2.2.	Analyse des interactions formées entre FKBP12 et le ligand dans EC1 et EC2	102
2.2.1.	Interactions permanentes	103
2.2.2.	Interactions transitoires entre deux groupes d'atomes	107
2.3.	Conclusions des analyses de FKBP12 et du ligand dans EC1 et EC2	111
5	Protocole de décomplexation et étude des états intermédiaires	119
1.	Simulations de décomplexation et stabilisation des ensembles de structures métastables	119
2.	Les simulations SBD comme dernière étape de la recherche des états intermédiaires	132
3.	Caractéristiques des états intermédiaires	136
3.1.	Structure des EI	136
3.2.	Position du ligand dans le site de fixation de FKBP12	142
3.3.	Mobilité de FKBP12 et du ligand	146
3.4.	Analyse des interactions formées dans les EI	150
3.4.1.	Analyse des interactions permanentes	150
3.4.2.	Analyse des interactions transitoires	162

3.4.3.	Analyse des orbitales moléculaires	168
3.4.4.	Résumé des interactions formées dans les EI	169
6	Discussion	177
1.	Discussion des caractéristiques principales des EI	177
2.	Transposition du modèle de l'état intermé- diaire à d'autres ligands de FKBP12	181
3.	Les EI permettent d'expliquer les différences d'affinité entre certains ligands de FKBP12	183
4.	Importance des interactions de type π-π dans la reconnaissance moléculaire	185
5.	Propriétés structurales importantes du cœur des ligands de FKBP12	188
7	Conclusion	191
	Annexes	196
	Bibliographie	223

Table des figures

1.1	Structures de FKBP12 et des ligands FK506, Rapamycine, 8 et 308	4
1.2	Structures des ligands 5 et 7	5
2.1	Représentation du découpage du système lors des simulations SBD.	22
3.1	Résumé des étapes à suivre lors de la définition de nouveaux paramètres dans CHARMM22 et exemple pour la paramétrisation de la rotation autour de la liaison C-C du β -mercapto- α -céto-propanal	26
3.2	Molécule modèle du ligand 8 utilisée pour la paramétrisation des charges partielles des atomes représentés	31
3.3	Découpage des structures des ligands 8 et 308 en quatre parties	36
3.4	Structures des ligands 8 et 308 accompagnées des structures des molécules déjà paramétrées dans CHARMM22 présentant des correspondances avec des parties de ces ligands	38
3.5	Structures des molécules modèles de 8 et 308 utilisées pour la détermination des nouveaux paramètres	62
3.6	Alignement des molécules modèles M81 utilisées pour l'optimisation des charges partielles des atomes de ce modèle pour lequel la numérotation est identique à celle de 8 sauf pour les atomes H9, H10, H11, H21 et H22	64
3.7	Alignement des modèles simplifiés M81' utilisés pour l'optimisation de la charge partielle de l'atome 8-O1	64
3.8	Alignement des molécules modèles M3081 utilisées pour l'optimisation des charges partielles des atomes de ce modèle pour lequel la numérotation est identique à celle de 308 sauf pour les atomes H98 et H99	65

TABLE DES FIGURES

3.9	Alignement des profils d'énergie potentielle HF/6-31G* et MM en fonction de la variation de l'angle de valence $C3 - \widehat{S4} - C5$ ou $N7 - \widehat{S8} - C17$	66
3.10	Profils énergétiques pour les angles dièdres des liaisons C17-C16, C16-C15, C24-C15, C15-O1, C1-C2, N7-C8, C8-C9, et C9-C10 du ligand 8	67
3.11	Profils énergétiques pour les angles dièdres des liaisons C31-O3, C30-C15, C15-N1, C1-C2, C3-S4, N7-S8 et C17-S8 du ligand 308	69
3.12	Scan optimisé de la rotation autour des liaisons covalentes C8-C9 et C9-C10 du ligand 8	71
3.13	Alignement de la géométrie du ligand 8 et du ligand 308 optimisée par MM sur la géométrie optimisée en HF/6-31G* et sur la géométrie tirée de la structure cristallographique	72
4.1	Structures cristallographiques des complexes FKBP12- 8 (SC1) et FKBP12- 308 (SC2), et assignation des structures secondaires de FKBP12 obtenues par le programme DSSP	91
4.2	Analyse des fréquences moyennes de contact des liaisons hydrogènes de l'ensemble LHSC pour les simulations LD et SBD de EC1 et de EC2	94
4.3	Valeurs de RMSF des atomes C $^{\alpha}$ en fonction du numéro du résidu et des atomes lourds du ligand en fonction de leurs noms pour EC1 et SC1, et pour EC2 et SC2	100
4.4	Ensembles des contacts formés entre la partie Ph1 du ligand 8 avec le résidu Tyr82 et le résidu Ile56 dans SC1	103
4.5	Listes des valeurs moyennes issues des simulations LD et SBD des 57 et 74 distances de séparation respectivement entre les atomes de FKBP12 et du ligand 8 et entre ceux de FKBP12 et du ligand 308	114
4.6	Cartes des nombres d'interactions formées entre FKBP12 et le ligand 8 dans SC1 et au cours des simulations LD1 et SBD1, et entre FKBP12 et le ligand 8 dans SC2 et au cours des simulations LD2 et SBD2	116
4.7	Comparaison des positions des parties Ph1 du ligand 8 dans SC1, LD1 et SBD1, Ph2 de 8 dans SC1, LD1 et SBD1, iPe de 8 dans SC1, LD1 et SBD1, EtHe du ligand 308 dans SC2 et LD2, EtHe de 308 dans SC2 et SBD2, et Tol de 308 dans SC2, LD2 et SBD2	117

TABLE DES FIGURES

4.8	Résumé des interactions formées entre FKBP12 et le ligand 8 dans EC1, et FKBP12 et le ligand 308 dans EC2	118
5.1	Recherche et stabilisation des ensembles de structures métastables observés lors des simulations de décomplexation réalisées sur des structures tirées des simulations LD des deux états complexés puis sélection des candidats pour l'étape de filtrage utilisant des simulations en solvation explicite	120
5.2	Importance de la valeur de la distance séparant les atomes formant le couple de la coordonnée de réaction	123
5.3	Suivi des distances séparant les centres de masse des parties du ligand 308 et du site de fixation de FKBP12, les atomes 308 -N1 et Glu5-C α ainsi que des RMSD des atomes C α de la protéine et de la boucle 80 au cours d'une simulation de décomplexation et d'une simulation de stabilisation de l'ESM tiré de la décomplexation	125
5.4	Comparaison de la position des ligands 8 et 308 dans le site de fixation de FKBP12 dans SC et dans EI	134
5.5	Histogramme des valeurs moyennes avec les déviations standards des RMSF calculées pour les résidus qui forment des contacts avec le ligand 8 dans EI1 et le 308 dans EI2	147
5.6	Nombre moyen d'interactions formées entre chaque paire de groupes d'atomes de FKBP12 et du ligand 8 dans EI1 et du ligand 308 dans EI2	163
5.7	Suivi des distances séparant les parties périphériques de 8 et quelques atomes de la protéine au cours des simulations SBD de EI1	165
5.8	Histogramme des caractéristiques de distances particulières pour Ph1, Gln53 et Tyr82	172
5.9	Recouvrement orbitalaire entre la partie Ph1 de 8 et le cycle aromatique de la chaîne latérale du résidu Tyr82 calculé pour EI1 à un niveau de théorie semi-empirique	173
5.10	Configurations principales retrouvées lors d'une interaction de type π - π entre deux cycles aromatiques	173

TABLE DES FIGURES

5.11	Résumé des interactions formées entre FKBP12 et le ligand 8 dans EI1, et FKBP12 et le ligand 308 dans EI2	174
6.1	Superposition des parties de cœur des ligands 8 et FK506 sur la structure de l'EI1	182
6.2	Structure de quelques ligands analogues au ligand 8 et motif central souvent retrouvé pour les ligands de haute affinité pour FKBP12	186
A.1	Positions des chaînes latérales des résidus de FKBP12 dans SC1 avant et après modifications	205

Liste des tableaux

3.1	Résumé des paramètres à déterminer pour les ligands 8 et 308	46
3.2	Distances et énergies des interactions optimales entre la molécule d'eau et les atomes dont les noms sont soulignés sur la figure 3.5 (A), calculées HF/6-31G* ou par mécanique moléculaire	50
3.3	Distances et énergies des interactions optimales entre la molécule d'eau et les atomes dont les noms sont soulignés sur la figure 3.5 (B), calculées HF/6-31G* ou par mécanique moléculaire	51
3.4	Paramètres optimisés pour les angles de valence du ligand 308	55
3.5	Paramètres optimisés pour les angles dièdres du ligand 8	57
3.6	Paramètres optimisés pour les angles dièdres du ligand 308	58
4.1	Liste des atomes d'hydrogène de SI1 qui ont été manuellement réorientés . . .	76
4.2	Nouveaux rotamères pour les chaînes latérales des résidus Glu31, Lys35, Phe46, Glu60, Glu61, Asp79, Tyr80 et Phe99 de SI1 sélectionnés à partir de la librairie de rotamères de Dunbrack	78
4.3	Ensemble de contraintes CNTR3	81
4.4	Ensemble de contraintes CNTR4	83
4.5	Récapitulatif des ensembles de contraintes utilisés au cours des différentes étapes de simulation des états EC1 et EC2	84
4.6	Récapitulatif des temps de production pour les simulations LD et SBD des états EC1 et EC2	85
4.7	Valeurs moyennes et écarts types des RMSD pour les différents groupes d'atomes de la protéine et du ligand après alignement des atomes C ^α sur leur position de référence	88

LISTE DES TABLEAUX

5.1	Classification des ESM observés lors de l'application du protocole pour expulser le ligand 8 et le ligand 308 du site de fixation de FKBP12	128
5.2	Analyse de la structure de FKBP12 dans EI1 et dans EI2	140
5.3	Analyse de la déformation de la petite cavité latérale du site de fixation formée par les chaînes latérales volumineuses de la boucle 80 pour les complexes FKBP12- 8 et FKBP12- 308	142
5.4	Analyse du déplacement des ligands 8 et 308 dans le site de fixation de FKBP12 respectivement entre EI1 et SC1/EC1 et entre EI2 et SC2/EC2	144
5.5	Valeurs moyennes des distances de certains contacts formés entre FKBP12 et le ligand 8 dans EI1	152
5.6	Valeurs moyennes des distances de certains contacts formés entre FKBP12 et le ligand 308 dans EI2	155
5.7	Énergies d'interaction (kcal/mol) calculées pour les couples parties périphériques de 8 / résidus de FKBP12 qui forment le plus d'interactions dans EI1 . .	175
5.8	Énergies d'interaction (kcal/mol) calculées pour les couples parties périphériques de 308 / résidus de FKBP12 qui forment le plus d'interactions dans EI2 .	176
A.1	Nouveaux types atomiques définis pour les atomes des ligands 8 et 308	196
A.2	Charges partielles des atomes des ligands 8 et 308	197
A.3	Tableau des charges partielles atomiques obtenues par une analyse de population de Mulliken après optimisation par la méthode MP2/6-31G* des cycles Ph1 et Tol respectivement des ligands 8 et 308	199
A.4	Paramètres du champ de force CHARMM22 définis pour les liaisons covalentes formées entre les atomes de 8 et entre les atomes de 308 accompagnés des correspondances	200
A.5	Paramètres du champ de force CHARMM22 définis pour les angles de valence de 8 et 308 accompagnés des correspondances	201
A.6	Paramètres du champ de force CHARMM22 définis pour les angles dièdres de 8 et 308	203
A.7	Paramètres du champ de force CHARMM22 définis pour les angles dièdres de 8 et 308	205

A.8	Liste des liaisons hydrogènes formées entre des atomes du squelette de la protéine FKBP12 avec les distances de contact mesurées sur les structures cristallographiques des deux complexes	206
-----	--	-----

Liste des abréviations

A

ABNR *Adopted-Basis set Newton-Raphson*. 49, 60, 77

B

BMD *Biased Molecular Dynamics*. 11, 22, 121, 122, 124, 135, 191

C

CG *gradients conjugués*. 77, 80

CM *centre de masse*. 122

E

EC *état complexé*. 73, 99, 137, 138, 141–143, 146, 149, 150, 162, 169, 179, 180, 188

EEF1 *Effective Energy Function 1*. 11, 19, 20, 74, 191

EI *état intermédiaire*. 119, 136–138, 141–143, 146, 149, 150, 161, 162, 167, 169–171, 177–180, 183, 185, 187–189, 191–194

ESM *ensemble de structures métastables*. 119, 124, 126, 127, 132, 133, 135

L

LD *dynamique moléculaire de Langevin*. 11, 12, 20, 74, 77, 79–82, 86, 87, 95–99, 101–103, 105–113, 121, 122, 127, 132, 133, 135, 191

LPDB *Ligand-Protein DataBase*. 35, 39, 42, 43

M

MM *mécanique moléculaire*. 29, 30, 32, 33, 47, 49, 52–56, 59, 60

P

PDB *Protein Data Bank.* 5, 73, 74

R

RC *coordonnée de réaction.* 22, 121

RMSD *Root mean square deviation.* 52, 60, 87, 89, 92, 95–97, 99, 111, 122, 124, 126, 127, 133, 135–139, 142, 143, 187

RMSF *Root mean square fluctuation.* 87, 98, 99, 101, 106, 107, 111, 146, 149, 161, 162, 178, 179

S

SBD *Stochastic Boundary molecular Dynamics.* 11, 12, 21, 74, 75, 79, 82, 86, 87, 95–99, 101–103, 105–112, 127, 132, 133, 135–138, 150, 151, 160, 161, 163, 164, 166, 169, 170, 183, 188, 191

SD *steepest descent.* 77, 80, 84

Chapitre 1

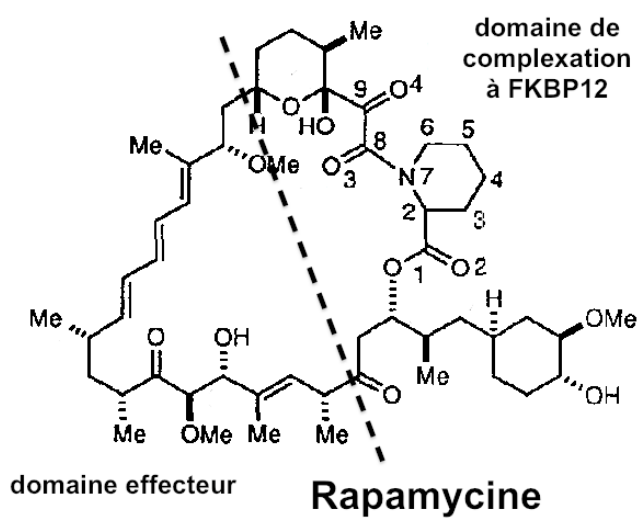
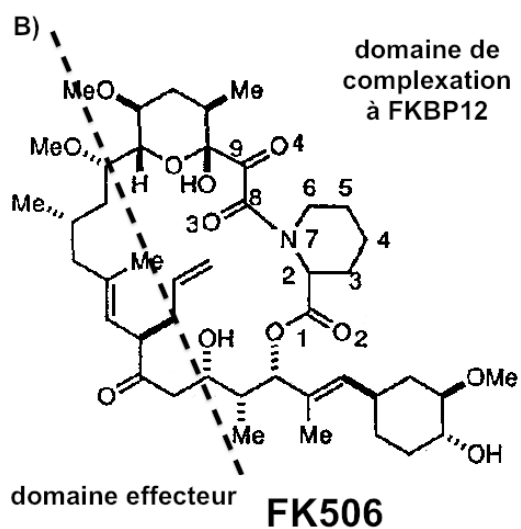
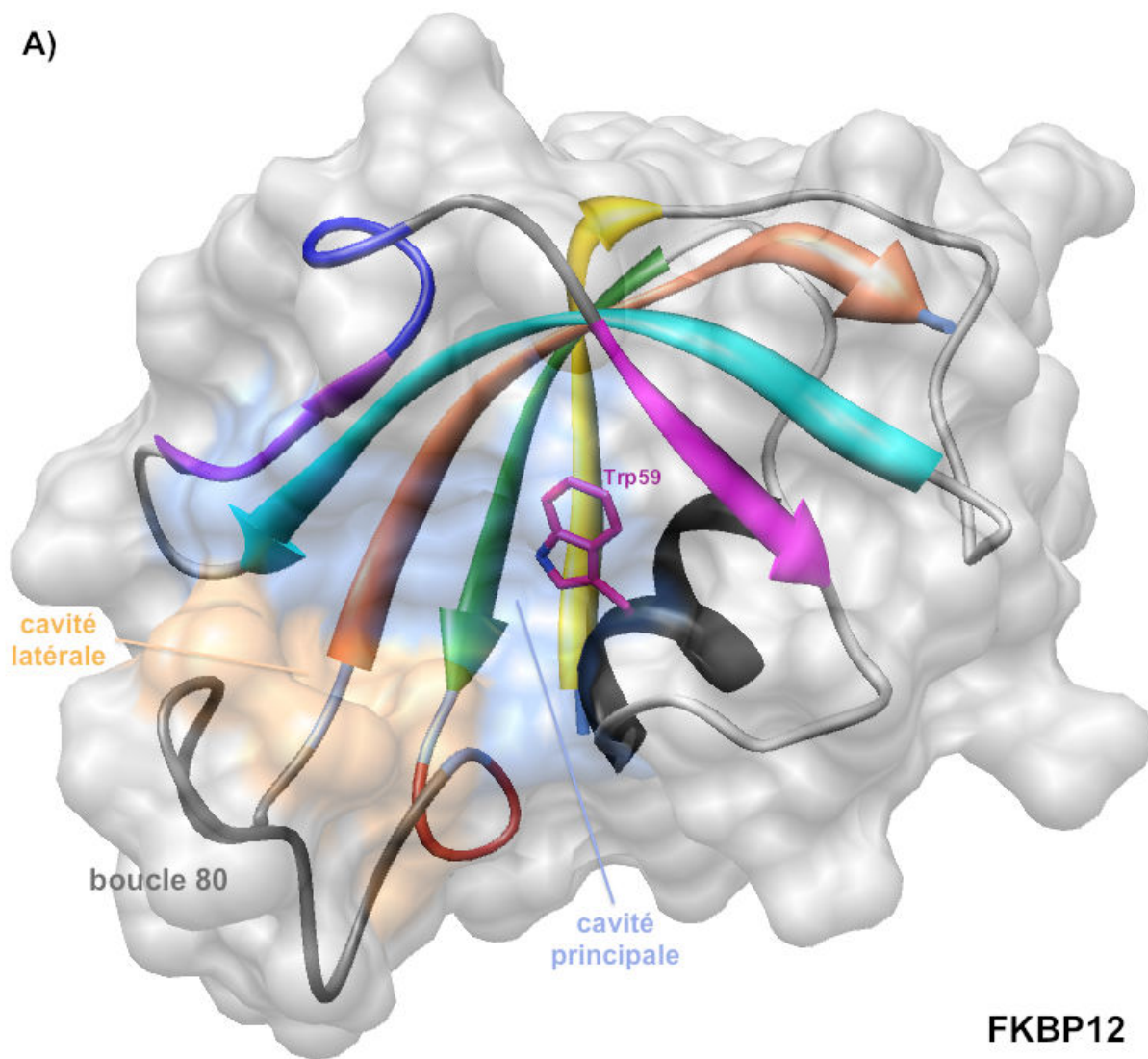
Introduction

La protéine FKBP12 est une enzyme formée de 107 résidus d'acides aminés principalement retrouvée dans le cytosol et qui catalyse des réactions d'isomérisation cis-trans des liaisons covalentes formées entre un résidu d'acide aminé et un résidu proline (sa structure est représentée sur la figure 1.1 (A)). De nombreuses études ont montré que cette protéine régule également l'activité de partenaires protéiques dans le cytosol, partenaires étant considérés comme les ligands naturels de FKBP12. Par exemple, FKBP12 est connue pour se lier au récepteur TGF- β de type I afin de prévenir une activation prématurée par des récepteurs TGF- β de type II [1]. FKBP12 joue un autre rôle cellulaire en se liant aux récepteurs ryanodine [2] et IP3 [3] afin de réguler le flux de Ca^{2+} à travers les canaux de ces récepteurs. La protéine FKBP12 tire son nom d'un de ses principaux inhibiteurs de haute-affinité, FK506 un métabolite d'origine bactérienne, et de sa masse moléculaire de 12 kDa (*FK506 binding protein*). Le ligand FK506 se lie fortement à FKBP12 avec une constante d'inhibition de l'activité isomérase de 0,6 nM [4]. La rapamycine, un autre métabolite d'origine bactérienne, est un autre ligand de haute affinité ($K_i = 0,3 \text{ nM}$) [4]. Dans les cellules de mammifères, la rapamycine se lie à FKBP12 pour former un complexe ternaire qui inhibe la protéine kinase mTOR [5]. La sur-activation de mTOR étant associée à la croissance tumorale, cette inhibition déclenchée par la rapamycine ou par un de ces analogues structuraux est considérée comme une approche thérapeutique prometteuse dans les traitements anti-cancéreux [6]. Dans les lymphocytes T, le complexe ternaire FKBP12-rapamycine-mTOR permet de réduire la prolifération de ces lymphocytes [7]. De manière similaire à la rapamycine, le ligand FK506 se lie à FKBP12 dans les lymphocytes T et

permet l'association avec une autre protéine, la calcineurine, un composant de la cascade signalétique conduisant à la transcription du gène de la cytokine IL-2. Cette cytokine, en se liant à son récepteur à la surface des lymphocytes T, contribue à la prolifération des lymphocytes T [8]. Rapamycine et FK506 sont dits immunosuppresseurs car leur domaine dit effecteur (montré sur la figure 1.1 (B)) permet l'association du complexe binaire FKBP12-ligand avec une autre protéine en bloquant la cascade signalétique à partir du récepteur de IL-2 pour le premier et en empêchant la prolifération des lymphocytes T en inhibant la voie de transcription de IL-2 pour le second. Ces propriétés immunosuppressives de la rapamycine et de FK506 sont actuellement utilisées dans les traitements anti-rejet suite à des greffes [9, 10]. Dans le cerveau, le niveau d'expression de FKBP12 est beaucoup plus important que dans les tissus immunitaires et, dans les neurones, le complexe FKBP12-FK506 a été associé à des propriétés neuroprotectrices [11]. Des propriétés régénératrices de nerfs sont également induites par FK506 ou par des analogues et celles-ci impliquent FKBP12 et l'isoforme FKBP52 dont le domaine N-terminal de fixation à FK506 est très similaire en séquence et en structure à FKBP12 (55% d'homologie de séquence avec FKBP12) [12]. Beaucoup d'efforts sont consacrés à la recherche d'analogues de FK506 qui possèdent des activités neurotrophes et/ou neuroprotectrices mais dépourvus de l'activité immunosuppressive associée, en terme structural, à la partie effectrice du ligand. Ces molécules sont prometteuses pour le développement de traitement de maladies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. Le ligand **8**, dont la structure est présentée sur la figure 1.1 (C), est un exemple de ligand dépourvu de propriétés immunosuppressives.

Le développement de ligands pour FKBP12 représente donc un intérêt majeur. Une difficulté provient cependant du fait que, pour une molécule donnée, il n'existe aucune relation claire entre sa structure et sa capacité de liaison à FKBP12. Afin de tenter de répondre à ce problème, nous avons étudié deux complexes formés par FKBP12, l'un avec le ligand **8** dont l'affinité est mesurée par une constante d'inhibition de l'activité isomérase de 10 nM, l'autre avec le ligand **308** pour lequel la constante de dissociation est estimée à 40 fois celle de la rapamycine (déterminée entre 0,2 et 0,35 nM [13, 14]), soit entre 8 et 14 nM [15] (figure 1.1 (C)). Ces deux ligands sont de plus structuralement différents. Au lieu de s'intéresser à la structure et à la dynamique des complexes formés à partir de ces ligands, cette étude vise à caractériser un intermédiaire de complexation. Cet intermédiaire précède la formation du complexe et

A)



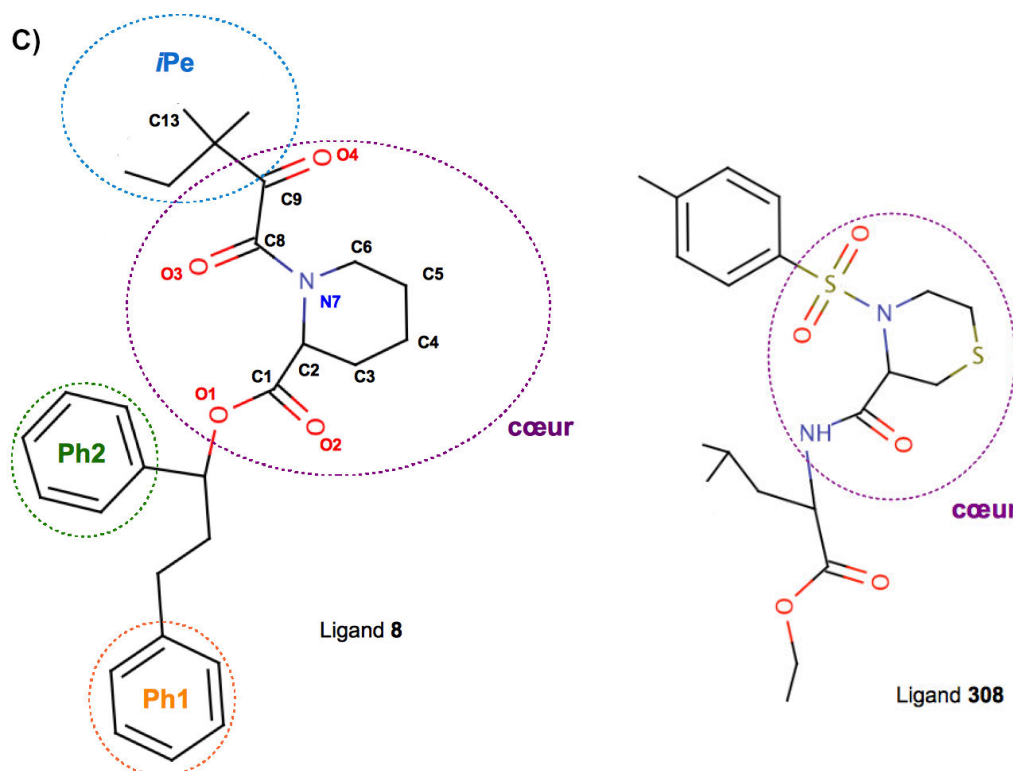


FIGURE 1.1 – (A) Structure de la protéine FKBP12 représentée avec sa surface et ses structures secondaires en différentes couleurs. Les surfaces des résidus formant les cavités principale et latérale sont respectivement colorées en bleu clair et en marron clair. Ces cavités sont principalement formées respectivement par les résidus Tyr26, Phe36, Asp37, Phe46, Val55, Ile56, Trp59 et Phe99, et Tyr82, His87, Ile90 et Ile91. La chaîne latérale du résidu Trp59 formant le fond de la cavité principale est également représentée. (B) Structures des ligands FK506 et rapamycine. Ces deux ligands partagent un domaine de complexation à FKBP12 dont les groupements et les structures sont similaires et présentent deux domaines effecteurs distincts. Après complexation du ligand à FKBP12, la partie effectrice du ligand contribue à la formation d'un complexe ternaire avec d'autres partenaires protéiques (la calineurine et mTOR pour respectivement les complexes FKBP12-FK506 et FKBP12-rapamycine). (C) Structure des ligands **8** et **308**. Le cœur de chacun de ces deux ligands est indiqué ainsi que les parties périphériques pour **8**.

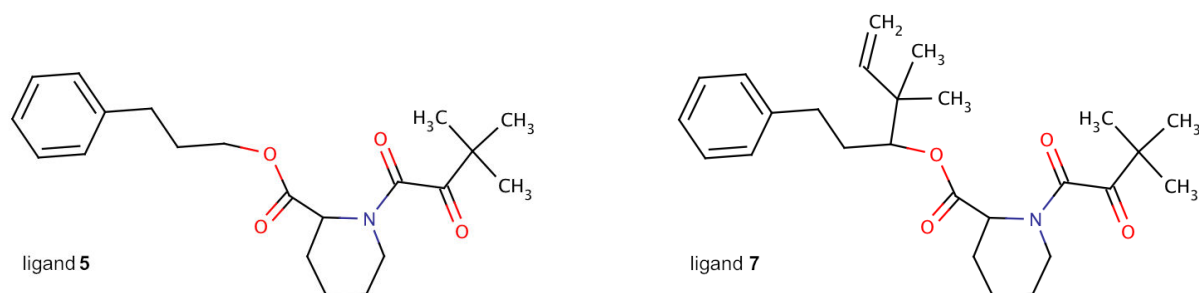


FIGURE 1.2 – Structure des ligands **5** et **7**. Les constantes d’inhibition de l’activité isomérase de FKBP12 déterminées par Holt *et al.* pour ces deux ligands sont respectivement de 110 et 250 nM [17].

constitue l’aboutissement d’une première étape de recherche des premiers contacts intermoléculaires entre les deux partenaires. Dans cet état intermédiaire, nous faisons l’hypothèse que les interactions à courte distance pourraient jouer un rôle déterminant dans la reconnaissance et/ou l’affinité entre partenaires moléculaires [16]. L’analyse de l’état intermédiaire pourrait en particulier fournir des informations sur les caractéristiques structurales des ligands **8** et **308** qui permettent d’expliquer leur affinité pour cette protéine.

Deux observations réalisées à propos de FKBP12 et de ses différents ligands connus nous ont conduits à rechercher un intermédiaire de complexation. La première observation est l’absence de relation entre les structures de ces ligands et leur affinité mesurée pour FKBP12. Considérons d’abord la partie de cœur retrouvée dans la plupart de ces ligands, allant de l’atome O1 à la liaison C9O4 du ligand **8** sur la figure 1.1 (C). Cette partie est systématiquement la plus enfouie dans le site de fixation. Ces parties de cœur dans les complexes respectifs sont quasi-superposables et forment ainsi les mêmes contacts avec la protéine dans la structure cristallographique (45 contacts pour **8**^a). Les autres parties périphériques ne forment souvent que peu de contacts avec la protéine (12 contacts pour **8**) mais leur incidence sur l’affinité semble être déterminante. En effet, la comparaison des valeurs de constante d’affinité de quelques ligands proches structuralement de **8** indique que l’affinité est plus faible lorsqu’une de ces trois parties périphériques (Ph1, Ph2 et *i*Pe) est manquante [19, 17]. La modification d’une de ces

^a. Les contacts formés entre le ligand **8** et FKBP12 ont été observés sur la structure cristallographique du complexe FKBP12-**8** d’une résolution de 2 Å déposée dans la *Protein Data Bank* (PDB) [18] sous le code 1FKG.

parties entraîne également d'importantes conséquences sur les valeurs de constante d'affinité. Une illustration est donnée avec les différences entre les K_i mesurés pour les ligands **5** et **8** d'une part, et entre les ligands **7** et **8** d'autre part (figures 1.1 (C) et 1.2). Bien que la structure cristallographique du complexe formé entre **5** et FKBP12 ne soit pas disponible, Lamb et Jorgensen ont conclu de leurs calculs de perturbation de l'énergie libre par simulations Monte Carlo que **5** se liait à FKBP12 de manière similaire à **8** [20]. Concernant le ligand **7**, sans aucun calcul ou structure expérimentale disponible, il est raisonnable de penser que son mode de liaison à la protéine serait également similaire à celui de **8**. Leur mode de liaison étant le même, les différences constatées entre K_i apparaissent alors surprenantes puisque le groupement Ph2, dans la structure cristallographique de **8**, est orienté vers l'extérieur du site de fixation de FKBP12 et ne fait aucun contact avec la protéine (les plus courtes distances de contact sont trouvées à 4,5 Å avec les atomes Glu54-O et His87-N^{ε2}) [17, 19]. Holt *et al.* [17] ont attribué la différence entre K_i des ligands **5** et **8** à une interaction intramoléculaire formée par la partie Ph2 de **8**. Cependant, ce simple contact ne peut expliquer de manière satisfaisante la différence importante mesurée pour les K_i .

Afin de tenter d'expliquer cette différence, l'aspect dynamique des ligands a également été examiné à partir des calculs de simulations moléculaires de complexes entre FKBP12 et plusieurs de ses ligands [20, 21, 22]. En comparant les ligands **5** et **8**, Lamb et Jorgensen ont montré que la perte de contacts hydrophobes occasionnée par la suppression de la partie Ph2 peut expliquer la différence d'affinité (dans les simulations, les atomes de la protéine Glu54-O, His87-N^{ε2} et Tyr82-O^η forment des contacts avec la partie Ph2) [20]. Wang *et al.* ont reproduit avec précision les énergies libres de complexation entre FKBP12 et une série de ligands analogues au ligand **8** [21]. Leur étude souligne le fait que l'énergie libre de complexation est dominée par la contribution de contacts hydrophobes mais aussi par la pénalité entropique due à la perte des degrés de liberté de translation, de rotation et de conformation des ligands. Par ailleurs, concernant les contacts hydrophobes, Yang *et al.* ont montré par mutagenèse dirigée que ce type de contact réalisé par le ligand ne semblent en réalité pas être la cause principale permettant d'expliquer son affinité [23]. Les auteurs ont conçu une petite cavité à la position occupée par Phe36 grâce au mutant F36V de FKBP12. Différents ligands ont été synthétisés portant des groupements susceptibles de « remplir » cette cavité et ainsi augmenter la surface

de contact intermoléculaire. Les résultats montrent que l'affinité n'est pas liée à la complémentarité entre la protéine et son ligand, *i.e.* au nombre de contacts hydrophobes. Ainsi, les travaux présentés ci-dessus permettent de comprendre (i) que l'entropie du ligand contribue de manière importante à l'énergie libre de complexation et (ii) qu'il est en conséquence difficile d'établir une relation entre la structure et l'affinité pour les ligands de cette protéine.

Les ligands de haute affinité (de l'ordre du nanomolaire) de FKBP12 peuvent différer uniquement par leurs parties périphériques, comme indiqué précédemment, mais également par leur partie de cœur. Par exemple, le cycle central trouvé dans la partie de cœur de ces ligands peut être un cycle pipécolinyle [23], un cycle pyrrolidinyle [20], ou un cycle thiazane [24]. Dans d'autres ligands qui se lient à FKBP12 ou à ses isoformes en favorisant la croissance neuritique (toutes les isoformes partagent un domaine de complexation à FK506 hautement conservé), des formes alkyles ouvertes telles qu'un groupement propyle par exemple remplacent le cycle central [25]. Dans d'autres, la fonction α -dicétone du cœur est remplacée par un groupement sulfonyle [24], ou réduite à une simple fonction cétone [23]. Une difficulté est donc de comprendre comment des ligands dont les parties de cœur diffèrent autant peuvent se lier à la protéine avec une grande affinité. En d'autres termes, il faudrait pouvoir clarifier les relations entre structure et activité pour les parties de cœur mais aussi pour les parties périphériques des ligands. Le but de cette étude est d'élucider les déterminants structuraux des ligands **8** et **308** de FKBP12 qui expliquent leur affinité pour cette protéine grâce à la caractérisation d'un état intermédiaire sur leurs chemins de complexation respectifs.

Avant de présenter l'approche choisie pour tenter de résoudre ces questions, il est d'abord nécessaire de considérer la deuxième observation réalisée à partir des complexes formés par FKBP12, laquelle a également motivé cette étude et qui est liée à la structure du site de fixation de la protéine. Dans la structure native du complexe FKBP12-**8** (nommé SC1 par la suite ; code PDB 1FKG), le ligand **8** est largement enfoui dans le site de fixation avec seulement 30% de sa surface exposée au solvant [17]. Le cycle pipecolinyle (C2N7 sur la figure 1.1 (C)) est enfoui dans une profonde cavité et fait face au noyau indole du résidu Trp59 (figure 1.1 (A)). La partie isopentyle (*i*Pe sur la figure 1.1 (C)) repose dans une cavité adjacente formée par les chaînes latérales des résidus Tyr82, His87, Ile90 et Ile91 appartenant à une boucle appelée 80 (figure 1.1 (A)) ; le groupement méthyle du C13 plonge dans cette petite cavité adjacente. D'après ces

observations, un mécanisme de complexation en une étape entre le ligand **8** et une structure rigide de FKBP12 et qui nécessiterait le positionnement simultané du cycle pipécolinyle et du C13 dans leur cavité respective correspondrait à une entropie d’activation très importante entre l’état de libre diffusion des deux partenaires et l’état de transition de complexation. Cette importante entropie d’activation pourrait cependant être contrebalancée par un terme enthalpique d’activation favorable, dû à des interactions, de même que par un gain entropique associée à la désolvatation probablement partielle des parties hydrophobes du ligand dans cet état de transition ; dans ce cas précis, la protéine étant rigide son entropie ne peut intervenir dans la compensation de l’entropie d’activation. Dans cet état de transition, le pré-positionnement favorable du ligand conduirait ensuite au complexe final par diminution de l’énergie libre grâce, notamment, à l’augmentation du nombre de contacts intermoléculaires. Un autre scénario pour cette complexation, toujours dans le cas d’une protéine rigide, consisterait en l’insertion du cycle pipécolinyle avant le groupement méthyle du C13 ou inversement. Mais le mécanisme s’effectuerait alors vraisemblablement en deux étapes avec apparition d’un état intermédiaire borné par deux états de transition dont les franchissements seraient moins fortement pénalisés par les contributions d’entropie d’activation qui seraient réparties sur les deux énergies d’activation. Ce scénario est proche des résultats de la récente étude de Lapelosa *et al.* utilisant la dynamique moléculaire *λ -hopping Hamiltonian parallel replica exchange* où les répliques de simulation diffèrent par la valeur λ qui contrôle la force des interactions protéine-ligand (la limite $\lambda = 0$ représentant le système dans lequel les atomes sont traversés par d’autres sans gêne stérique occasionnée) [26]. Dans ces simulations, il est à noter que la flexibilité du squelette de FKBP12 est restreinte à un déplacement de 4 Å autour de sa position de référence. Dans l’état intermédiaire trouvé, le ligand **8** forme une seule des deux liaisons hydrogènes du complexe final, une rotation autour de la liaison C1–C2 permet ensuite de s’affranchir des contraintes stériques restantes et de former la deuxième liaison hydrogène dans le complexe final. Il faut préciser que ce chemin de complexation en deux étapes est « alchimique » étant donné les interactions non-physiques dans les répliques (atomes en traversant d’autres) qui ont pour but de diminuer les gênes stériques. Cependant, pour le ligand de plus grande taille FK506, les auteurs indiquent que la très haute barrière de complexation ne peut être franchie lorsque la conformation de la protéine et en particulier celle de la boucle 80 reste restreinte, et ceci même pour des valeurs

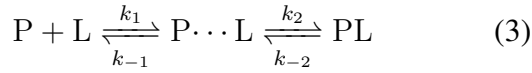
de λ faibles [26]. Zacharias a réalisé des calculs de *docking* (complexation à l'aide d'un logiciel) du ligand FK506 sur une conformation rigide de FKBP12 calculée comme conformation moyenne à partir de simulations [27]. L'auteur n'a pas pu identifier dans un premier temps de géométrie pour le complexe qui soit proche de celle expérimentale en raison de gêne stérique. Dans une deuxième tentative de complexation où la relaxation de la protéine était permise, une déformation importante de la boucle 80 a permis de faciliter l'accès aux cavités dans le site de fixation et d'obtenir une structure proche de la structure expérimentale. Ainsi la flexibilité de la protéine apportée par la boucle 80 pourrait faciliter la complexation à FKBP12 de ligand tel que FK506 ou de dérivé comme le ligand **8**. Cette hypothèse est également étayée par une étude comparative entre la structure expérimentale de FKBP12-FK506 et celle de l'apoprotéine dans laquelle les auteurs ont conclu que, durant la complexation, la boucle 80 doit se déplacer comme un ensemble rigide avec, en particulier, les résidus His87 et Ile90 qui doivent subir des déplacements importants [28]. Une étude RMN sur FKBP12 isolée a montré que la boucle 80 était très mobile, spécialement dans la région entre les résidus Tyr82 à Ile90 [29]. D'autres études RMN indiquent également que cette boucle dans l'apoprotéine balaye au moins deux conformations [30]. Les travaux ci-dessus mentionnés suggèrent donc que, durant la complexation, la boucle 80 subit des transitions conformationnelles afin de faciliter l'entrée du ligand dans le site de fixation en réduisant les gênes stériques.

Les évènements successifs tels que le déplacement de la boucle 80, la formation des premiers contacts avec le ligand, et la formation du complexe final pourrait se dérouler en une seule étape, tous les évènements intervenant de manière concertée (réaction (1) ci-dessous). Cependant, ces évènements pourraient également intervenir en deux étapes avec la formation d'un intermédiaire de complexation comme premier évènement dans lequel la boucle 80 aurait déjà subi un déplacement. Cet état intermédiaire apparaissant sur le chemin de complexation des deux partenaires conduirait à un mécanisme d'association en deux étapes permettant de faciliter l'accès au site de complexation en réduisant à la fois les gênes stériques et la pénalité entropique, comme discuté ci-dessus (réaction (3) ci-dessous). Notre approche a donc consisté à localiser tout d'abord un état intermédiaire sur la surface d'énergie libre de FKBP12 pour chacun des ligands **8** et **308**. En quelque sorte, ce processus de complexation en deux étapes ressemblerait à ceux observés expérimentalement par Mittag *et al.* pour deux phosphopeptides

qui se lie à un mutant du domaine N-terminal SH2 de PI3-K [31]. Pour chaque phosphopeptide, ces auteurs ont montré l'existence d'un état intermédiaire sur le chemin de complexation et dont le temps de vie est lié à l'affinité de la protéine pour le ligand : plus l'affinité est élevée, plus le temps de vie de l'état intermédiaire est long. Dans ce cas, nous pouvons faire l'hypothèse que la constante de vitesse k_{-1} de l'équation (3) diminue lorsque le temps de vie de l'état intermédiaire augmente. Les auteurs ont également souligné que de tels états intermédiaires pourraient être plus largement retrouvés dans d'autres systèmes protéine-ligand. Une étude cinétique de l'association entre protéines a permis de relier la diminution de l'affinité entre Ras et un domaine de liaison Ras de Raf avec l'augmentation de la constante de vitesse k_{off} [32]. Grâce à un algorithme, Schreiber *et al.* ont pu prédire les variations d'affinité de l'inhibiteur BLIP pour TEM1 β -lactamase. Les auteurs ont trouvé que la mutation de résidus chargés de BLIP augmente la constante de vitesse k_{on} , conduisant à des constantes d'association K_a plus élevées, ce qui a également été vérifié expérimentalement.



$$K_a = [PL]/([P][L]) = k_{on}/k_{off} \quad (2)$$



$$k_{on} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \quad (4)$$

$$k_{off} = \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2} \quad (5)$$

Dans notre approche, il s'agit de tenter de rationaliser l'affinité d'un ligand pour la protéine FKBP12 sur la base de facteurs structuraux et dynamiques d'un état intermédiaire, facteurs qui auraient une influence sur au moins une des constantes de vitesses de l'équation (3) et par conséquent également sur k_{on} et/ou k_{off} . Pour chaque ligand, nous avons analysé cet état intermédiaire avec pour objectif de proposer une explication aux rôles joués par les parties de cœur et périphériques de ces ligands dans la stabilité de cet intermédiaire, stabilité qui lorsqu'elle augmente contribue à diminuer la constante de vitesse k_{-1} dans le processus (3). La diminution de k_{-1} entraîne alors une augmentation de k_{on} et donc aussi de K_a (équations (4) et (2)). Ainsi, comme pour les états trouvés par Mittag *et al.* [31], la stabilité d'un tel état pourrait être liée aux

propriétés de complexation des ligands. Les analyses de ces états intermédiaires pourraient également permettre de proposer une explication à la diversité des structures de la partie de cœur des ligands de haute affinité. Dans cette étude, les analyses sont basées sur les caractéristiques structurales des états intermédiaires.

Afin de localiser ces états intermédiaires, la dynamique moléculaire de Langevin (LD) [33] et le modèle analytique *Effective Energy Function 1* (EEF1) [34] pour les calculs de l'énergie libre de solvation ont été combinés. Comme première étape de recherche de ces états intermédiaires, le protocole de simulation LD/EEF1 a été testé afin de vérifier sa capacité à reproduire précisément les caractéristiques des structures cristallographiques des complexes FKBP12-**8** et FKBP12-**308** (codes PDB respectifs 1FKG et 1J4I). Afin de comparer les résultats issus de ces simulations avec des résultats dérivés de simulations effectuées avec un modèle de solvation explicite, la technique *Stochastic Boundary molecular Dynamics* (SBD) [35] a été utilisée en immergeant les complexes protéine-ligand dans une sphère de molécules d'eau. Après cette première étape de validation, des simulations LD/EEF1 ont été réalisées afin de « décomplexer » le ligand de la protéine, c'est-à-dire les éloigner. Dans ce but, une force externe a été introduite afin d'expulser le ligand hors du site de fixation de FKBP12. La force à introduire est choisie la plus faible possible car la perturbation introduite dans le système doit rester faible ; cependant, la force appliquée doit également permettre de séparer le ligand de la protéine dans un intervalle de temps raisonnable. La méthode *Biased Molecular Dynamics* (BMD) [36] a été utilisée dans ce but et un protocole spécifique a été développé. Une fois les états intermédiaires localisés par les simulations LD/EEF1 avec la force introduite par la méthode BMD, des structures représentatives de ces états ont été utilisées dans un protocole d'affinement utilisant les simulations SBD. Il n'est en effet pas recommandé d'utiliser un modèle de solvation explicite (SBD par exemple) pour l'étape de « décomplexation » du ligand en raison notamment de l'incompatibilité entre le temps de relaxation important des molécules d'eau et les forces d'expulsion du ligand qui sont appliquées [37]. Toutefois, l'utilisation subséquente lors de l'étape d'affinement de l'état intermédiaire d'une représentation explicite du solvant grâce aux simulations SBD est nécessaire pour trois raisons : (i) permettre d'augmenter la stabilité des états intermédiaires localisés lors des simulations LD, (ii) affiner les résultats puisque le modèle de solvation explicite fournit une description plus réaliste du système, et (iii) éliminer dans certains cas des

états qui peuvent apparaître comme des états intermédiaires à l'étape des simulations LD mais qui s'avèrent instables en simulations SBD. Les détails de cette procédure et son application à la recherche d'états intermédiaires formés au cours du processus de complexation du ligand **8** avec FKBP12 ont été publiés dans la revue *Journal of Chemical Theory and Computation* [38].

Il convient également de préciser que les conclusions tirées des analyses des états intermédiaires reposent sur l'hypothèse que les résultats obtenus pour ces expériences de « décomplexation » sont valables pour le processus inverse. Comme indiqué dans de précédentes études [37], cette hypothèse est valable lorsque le chemin de « décomplexation » est exploré dans des conditions de quasi-équilibre, conditions supposées remplies pour le protocole adopté dans lequel le solvant est représenté de manière implicite et les forces introduites pour l'expulsion du ligand restent faibles.

Dans le chapitre Méthodologie suivant, les méthodes de simulations moléculaires et de chimie quantique utilisées sont présentées. Dans le troisième chapitre, une version détaillée de la procédure de développement des nouveaux paramètres pour représenter les ligands **8** et **308** avec le champ de force CHARMM22 est fournie. Une étape préalable à la recherche des états intermédiaires a été de valider le protocole de simulation utilisant un modèle de solvation implicite. Cette étape de validation est l'objet du quatrième chapitre. Cette étape a permis également de récolter des données à partir des simulations pour les complexes natifs qui ont servi à la comparaison avec celles issues des simulations pour les états intermédiaires. La procédure de recherche des états intermédiaires ainsi que leurs caractéristiques structurales seront discutées dans le cinquième chapitre. Le sixième chapitre est l'objet d'une discussion sur les caractéristiques des états intermédiaires et leur relation possible avec l'affinité mesurée des ligands. Enfin, une conclusion générale est proposée.

Chapitre 2

Méthodologie

Dans ce chapitre, les différentes méthodes utilisées pour simuler les complexes FKBP12-ligand **8** et FKBP12-ligand **308** sont présentées.

1. Simulation de dynamique moléculaire

Pour les complexes FKBP12-ligand **8** et FKBP12-ligand **308**, des simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées afin de (i) stabiliser l'état complexé, (ii) expulser le ligand du site de fixation et (iii) stabiliser l'état intermédiaire (voir les chapitres 4 p. 73 et 5 p. 119). Afin d'effectuer ces simulations moléculaires, il est nécessaire d'utiliser un ensemble d'équations et de paramètres. Cet ensemble, appelé champ de force, permet de calculer de manière simplifiée les contributions des forces issues de la mécanique classique [39, 40]. La connaissance de l'action de ces forces sur chaque atome permet de simuler la dynamique du système.

1.1. Les champs de force

Les champs de force utilisés en dynamique moléculaire correspondent à des combinaisons d'expressions mathématiques et de paramètres empiriques qui servent à calculer de manière simplifiée les contributions énergétiques associées aux atomes d'un système moléculaire. En général, les champs de force utilisent un découpage de l'énergie potentielle en deux types principaux : l'un correspondant aux contributions covalentes ($E_{\text{interactions liées}}$), l'autre aux contributions non covalentes ($E_{\text{interactions non-liées}}$). À partir des formules 2.1a-c, il apparaît que les deux

groupes qui décomposent l'énergie potentielle E sont également subdivisés en plusieurs termes.

$$E = E_{\text{interactions liées}} + E_{\text{interactions non-liées}} \quad (2.1a)$$

avec :

$$E_{\text{interactions liées}} = E_{\text{liaisons covalentes}} + E_{\text{angles de valence}} + E_{\text{Urey-Bradley}} + E_{\text{angles dièdres}} + E_{\text{angles dièdres impropres}} \quad (2.1b)$$

$$E_{\text{interactions non-liées}} = E_{\text{van der Waals}} + E_{\text{électrostatiques}} \quad (2.1c)$$

Contribution des liaisons covalentes et des angles de valence De manière simplifiée, les fluctuations des distances de liaison covalente ainsi que celles des angles de valence autour de leurs valeurs de référence s'apparentent aux mouvements décrits par des oscillateurs harmoniques. Ces fluctuations sont donc communément modélisées par des systèmes à ressort [40]. L'énergie associée à ces systèmes peut être calculée d'après les équations 2.2 et 2.3. Ces équations comprennent un paramètre représentant la valeur d'équilibre obtenue lorsqu'aucune force n'est appliquée (distance r_0 et angle Θ_0) et une constante de force K_r qui modélise l'amplitude des fluctuations autour de la valeur d'équilibre^a.

$$E_{\text{liaisons covalentes}} = \sum_{\text{liaisons covalentes}} \frac{1}{2} K_r (r - r_0)^2 \quad (2.2)$$

$$E_{\text{angles de valence}} = \sum_{\text{angles de valence}} \frac{1}{2} K_{\Theta} (\Theta - \Theta_0)^2 \quad (2.3)$$

Le terme d'Urey-Bradley Dans certains champs de force comme ceux développés dans le programme CHARMM [41], un terme supplémentaire, appelé terme d'Urey-Bradley ($E_{\text{Urey-Bradley}}$) [42], est utilisé. Le terme d'Urey-Bradley est notamment utilisé dans le champ de force CHARMM22 pour ajouter une contrainte de distance entre deux atomes séparés par deux liaisons covalentes. Ce terme permet de tenir compte du couplage entre les vibrations des angles de valence et celles des deux liaisons covalentes associées à cet angle [43]. Ce terme est seulement utilisé pour des angles de valence particuliers [41]. Par exemple, pour un atome hybridé sp^2 , les trois liaisons covalentes qui l'entourent doivent rester dans un même plan. Ce plan est ainsi contraint par l'utilisation de termes d'Urey-Bradley. La forme de ce terme est similaire à celle décrite précédemment pour $E_{\text{liaisons covalentes}}$ et $E_{\text{angles de valence}}$. Le paramètre UB_0 représente la distance

^a. Il est important pour la suite de noter que, dans le champ de force CHARMM22, la fraction $\frac{1}{2}$ est intégrée dans la valeur du paramètre K_r ou du paramètre K_{Θ} .

d'équilibre séparant les atomes participant à l'angle de valence mais qui ne sont pas liées de manière covalente. Le paramètre K_{UB} correspond à la constante de force (voir équation 2.4).

$$E_{\text{Urey-Bradley}} = \sum_{\text{angles de valence particuliers}} K_{UB}(UB - UB_0)^2 \quad (2.4)$$

Contribution des angles dièdres classiques Les angles dièdres classiques correspondent à la rotation autour d'une liaison covalente, également appelée torsion. Le terme $E_{\text{angles dièdres}}$ ne représente pas un processus physique. Il est utilisé pour compenser les contributions des autres termes, notamment, mais pas seulement, l'énergie de van der Waals entre deux atomes séparés par trois liaisons covalentes, au profil énergétique de torsion. Par exemple, le profil de torsion pour le butane est décrit par plusieurs termes $E_{\text{angles dièdres}}$ de manière à obtenir une valeur minimale locale de l'énergie pour une conformation décalée et une valeur maximale locale pour une conformation éclipsée. L'énergie de torsion liée à la rotation autour d'une liaison covalente est modélisée par une fonction périodique dont la plus simple expression est présentée dans l'équation 2.5.

$$E_{\text{angles dièdres}} = \sum_{\text{angles dièdres}} K_{\Phi}(1 + \cos(n\Phi - \delta)) \quad (2.5)$$

L'utilisation de la fonction cosinus permet d'obtenir des profils énergétiques périodiques, *i.e.* présentant plusieurs valeurs d'angle dièdre classique qui correspondent à des valeurs minimales locales de l'énergie^b. Le paramètre n , appelé multiplicité ou périodicité de la rotation, est lié au nombre de minima énergétique par périodicité. Le paramètre δ , appelé phase, permet de définir les valeurs d'angle dièdre pour lesquelles le terme $E_{\text{angles dièdres}}$ est minimal. Les valeurs du paramètre δ permettant d'obtenir une énergie minimale pour une valeur d'angle Φ_0 choisie peuvent être calculés par la formule $\delta = n * \Phi_0 - 180$, d'après l'équation 2.5. Par exemple, dans le cas où aucune autre contribution n'est considérée, des valeurs de 2 et 180° respectivement pour les paramètres n et δ correspond à un profil énergétique qui présente deux minima énergétiques pour les valeurs d'angle Φ de 0° et 180°. L'allure du profil entre 0 et 180° est identique à celle observée entre 180 et 360°. Une constante de force K_{Φ} est utilisée afin de représenter les hauteurs des barrières énergétiques séparant les minima. Ce paramètre permet donc de limiter la possibilité de rotation autour d'une liaison covalente. Afin d'améliorer la modélisation de

^b. La fonction cosinus étant périodique sur 360° ($\cos(x) \in [-1; 1]$), pour obtenir une énergie positive ou nulle, il est nécessaire d'ajouter la valeur 1 aux résultats obtenus par la fonction cosinus.

l'énergie qui résulte de la rotation autour d'une liaison covalente, il est souvent utile d'étendre le terme $E_{\text{angles dièdres}}$ en utilisant une série de Fourier. Sans l'aide de ces séries, il est souvent impossible de représenter les profils énergétiques les plus complexes (voir sous-section 2.4.3. p. 55). Par exemple, pour la rotation autour de la liaison covalente formée entre les deux atomes centraux du butane, deux expressions doivent être combinées pour définir le terme $E_{\text{angles dièdres}}$. Une des expressions possède une périodicité de 2 et une phase de 180° , l'autre une périodicité de 3 et une phase de 0° . La combinaison de ces deux expressions permet d'augmenter les énergies correspondant aux conformations décalées gauche et droite afin d'obtenir le profil énergétique attendu pour cette rotation dans le butane. De plus, le terme $E_{\text{angles dièdres}}$ étant principalement utilisé pour compenser les contributions énergétiques des autres termes (notamment le terme $E_{\text{van der Waals}}$), il est possible de trouver des termes pour lesquels la valeur de la constante de force K_ϕ est négative (voir sous-section 2.4.3. p. 55).

Contribution des angles dièdres impropres L'angle dièdre impropre représente la possibilité pour la position d'un quatrième atome D lié à l'atome central B d'un angle de valence \widehat{ABC} de dévier par rapport au plan (ABC). L'utilité principale du terme $E_{\text{angles dièdres impropres}}$ est de contrôler la planéité de certaines parties telles que les liaisons peptidiques ou les systèmes π . La forme de ce terme (voir équation 2.6) est inspirée de celle décrite précédemment pour $E_{\text{liaisons covalentes}}$ et $E_{\text{angles de valence}}$ avec le paramètre ϕ_0 permettant de représenter la valeur de l'angle correspondant à la géométrie d'équilibre et la constante de force K_{imp} qui limite la déviation par rapport à cette valeur d'angle ^c.

$$E_{\text{angles dièdres impropres}} = \sum_{\text{angles dièdres impropres}} \frac{1}{2} K_{imp} (\phi - \phi_0)^2 \quad (2.6)$$

L'énergie électrostatique Le terme $E_{\text{électrostatique}}$ (voir équation 2.7) est l'énergie associée à la force de Coulomb [44].

$$E_{\text{électrostatique}} = \sum_{\substack{\text{couples d'atomes non-liés} \\ \text{paire d'atomes } ij}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (2.7)$$

^c. Comme précédemment, dans le champ de force CHARMM22, la fraction $\frac{1}{2}$ est intégrée dans la valeur du paramètre K_{imp} .

Afin de calculer l'énergie d'interaction entre deux atomes i et j , $E_{\text{électrostatique}}$ tient compte des charges partielles q_i et q_j de ces deux atomes ainsi que de la distance r_{ij} séparant ces deux atomes. La constante ϵ_0 représente la valeur de la permittivité du vide.

L'énergie de van der Waals Le terme de van der Waals $E_{\text{van der Waals}}$ permet de représenter l'énergie associée aux forces de dispersion de London [40] (partie attractive en $-\frac{1}{r^6}$ de l'énergie) et principalement à la répulsion interélectronique due au principe d'exclusion de Pauli [45] (partie répulsive en $\frac{1}{r^{12}}$). De part sa double composition (parties attractive/répulsive), le terme $E_{\text{van der Waals}}$ est représenté par un potentiel de Lennard-Jones 6-12 [46]. Ce terme, présenté dans l'équation 2.8, comporte une partie attractive (partie élevée à la puissance 6) et une partie répulsive (partie élevée à la puissance 12).

$$E_{\text{van der Waals}} = \sum_{\text{paire d'atomes } ij}^{\text{couples d'atomes non-liés}} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{\min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{\min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.8)$$

Le paramètre ϵ_{ij} , appelé paramètre de Lennard-Jones, est dépendant des types atomiques de i et de j (voir ci-dessous et sous-section 1.1.1.) et définit la valeur absolue du minimum énergétique pour l'interaction de van der Waals entre les atomes i et j . Le paramètre $R_{\min,ij}$, appelé rayon du cœur répulsif, définit la distance de séparation entre les atomes i et j pour laquelle l'énergie de van der Waals est minimale. Lorsque r_{ij} prend la valeur $R_{\min,ij}$, les forces répulsives et attractives s'annulent ce qui entraîne $E_{\text{van der Waals}} = -\epsilon_{ij}$. En général, les paramètres du terme $E_{\text{van der Waals}}$ pour les différentes paires d'atomes sont obtenus à partir des règles de combinaison de Lorentz-Berthelot [47, 48] :

$$\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i * \epsilon_j} \quad (2.9a)$$

$$R_{\min,ij} = (R_{\min,i} + R_{\min,j})/2 \quad (2.9b)$$

En fait, les paramètres du terme $E_{\text{van der Waals}}$ ne sont pas déterminés pour des couples d'atomes mais pour des types atomiques individuels (e.g., un carbone hybridé sp^2 est traité différemment d'un carbone hybridé sp^3). Pour cette raison, lors du développement d'un champ de force, il est nécessaire de créer différents types atomiques qui permettront de définir des paramètres spécifiques pour chacun de ces types atomiques (voir sous-section 2.1.1. p. 37).

1.2. Méthodes de simulation de dynamique moléculaire

L'ensemble des simulations de dynamique moléculaire présentée dans cette étude ont été réalisées en utilisant le programme CHARMM [41] avec l'algorithme d'intégration des équations newtoniennes du mouvement *leapfrog* [49] et un pas de temps d'une femtoseconde (fs). Afin d'utiliser un pas de temps d'une femtoseconde, les distances des liaisons covalentes formées avec des atomes d'hydrogène ont été fixées à leurs valeurs de référence (r_0) en utilisant l'algorithme *SHAKE* [50]. Les contraintes appliquées par *SHAKE* permettent d'éliminer les fluctuations de ces liaisons covalentes qui interviennent à des fréquences élevées, *i.e.* dans des temps très courts ($\sim 0,5$ fs). En utilisant *SHAKE*, l'énergie correspondant aux liaisons covalentes formées avec des atomes d'hydrogène n'intervient pas dans l'énergie finale.

Parfois, il est nécessaire d'appliquer d'autres types de contraintes afin de fixer ou restreindre les positions des atomes ou les distances séparant deux atomes non-liés. Dans le programme CHARMM, la commande *FIX* permet de fixer la position des atomes en utilisant des constantes de force élevées. Pour restreindre les fluctuations autour d'une valeur de référence pour les distances séparant deux atomes non-liés, les contraintes de type NOE sont utilisées par le programme CHARMM. Ces contraintes permettent de définir les valeurs minimale et maximale acceptées pour la distance de séparation. Pour les contraintes NOE appliquées dans cette étude, les valeurs des paramètres KMIN, KMAX et FMAX sont respectivement égales à 100, 100 et 500 kcal/mol/Å².

Lors des simulations de dynamique moléculaire, deux représentations du solvant peuvent être utilisées : représentation implicite et représentation explicite. Contrairement à la représentation explicite, dans une représentation implicite du solvant, les molécules d'eau ne sont pas incluses dans le système. Cette représentation implicite permet de tenir compte de certains effets relatifs au solvant (*e.g.*, effet d'écran des charges atomiques et/ou friction entre soluté et solvant) tout en diminuant, en général, les temps de calcul nécessaires. Pour la représentation explicite du solvant, il est possible de diminuer les temps de calcul en limitant le nombre de molécules d'eau incluses dans le système.

Certains processus biologiques interviennent dans des intervalles de temps non accessibles par les méthodes classiques de simulation. Il est parfois nécessaire d'introduire une force dans le système afin de simuler ces processus biologiques dans des temps de calcul raisonnables. Dans

les sous-sections suivantes, les méthodes de simulation utilisées dans cette étude employant une solvation implicite ou explicite et celles permettant d'introduire une force dans le système sont décrites.

1.2.1. Simulations de dynamique moléculaire Langevin, LD

Afin de diminuer la mobilité des atomes et de représenter plus précisément les effets du solvant, l'équation newtonienne du mouvement [39, 40] peut être remplacée par l'équation de Langevin (équation 2.10) [33].

$$m_i \vec{a}_i = m_i \frac{d\vec{v}_i(t)}{dt} = \vec{F}_i - m_i \gamma_i \vec{v}_i(t) + \vec{R}_i(t) \quad (2.10)$$

La force \vec{F}_i est calculée à partir de l'équation générale du potentiel énergétique par la relation : $\vec{F}_i = -\frac{\partial}{\partial \vec{r}_i} V(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N)$ avec $(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N)$ les coordonnées cartésiennes des atomes i à N . Le paramètre γ_i correspond au coefficient de friction de la particule i tandis que le vecteur $\vec{R}_i(t)$ représente la fonction aléatoire de fluctuation du soluté modélisant la collision avec le solvant. En fait, la fonction aléatoire est utilisée afin de compenser la perte énergétique due au phénomène de friction. Tandis que la force de friction dissipe l'énergie du système, la fonction aléatoire fournit une énergie additionnelle au système^d. Ce phénomène est appelé théorème de fluctuation-dissipation [52] et traduit la relation existante entre γ_i et $\vec{R}_i(t)$ permettant de maintenir la température du système constante. Du fait de ce phénomène, les dynamiques de Langevin possèdent donc un thermostat intégré.

Effective Energy Function 1 (EEF1) Afin de tenir compte des effets du solvant sur les interactions atomiques, dans cette étude, les simulations de dynamique de Langevin sont combinées à un modèle de représentation de l'énergie libre de solvation appelé *Effective Energy Function 1* (EEF1) [34]. Ce modèle est basé sur l'hypothèse que l'énergie libre de solvation d'une molécule correspond à la somme des contributions des groupes qui la constituent (déterminées à partir de fragments modèles) à laquelle se soustrait la perte de solvation due à l'exclusion

^d. Ainsi, le seul paramètre de l'équation de Langevin qui peut être ajusté correspond à γ_i . Plus la valeur du paramètre γ_i tend vers zéro, plus la simulation de dynamique de Langevin se rapproche d'une simulation de dynamique moléculaire classique. Il est également important de noter que la valeur optimale du coefficient de friction peut dépendre du modèle de solvation utilisé et, pour certains modèles, une valeur élevée peut permettre d'obtenir des résultats plus en accord avec les données expérimentales [51].

du solvant. L'utilisation de ce modèle permet de diminuer considérablement les temps de calcul tout en tenant compte des effets du solvant sur les interactions (temps de calcul de seulement 50 % plus long que pour des simulations effectuées dans le vide). Cependant, ce modèle ne permet pas directement de faire écran aux charges atomiques comme le feraient des molécules d'eau. Toutefois, cet effet d'écran peut être approximé par l'utilisation combinée d'un paramètre diélectrique variable et de charges réduites pour les groupes ionisés. Dans le modèle EEF1, une constante diélectrique linéairement dépendante de la distance (RDIE, $\epsilon = r$) a été choisie afin d'altérer le moins possible les liaisons hydrogènes formées par des atomes séparés par une faible distance tout en faisant écran aux charges des groupes intervenant à plus grandes distances. En effet, pour des interactions à faible distance, RDIE est équivalent à $\epsilon = 1$ alors que les interactions à moyenne et longue portée (généralement électrostatiques) sont diminuées de manière significative par l'emploi de RDIE.

Le modèle EEF1 a été développé en utilisant le champ de force CHARMM19 mais les développeurs de cette méthode ont également fourni des paramètres définis pour l'emploi de EEF1 avec le champ de force CHARMM22 comme utilisé dans cette étude. En revanche, une erreur a été décelée au niveau du fichier de topologie utilisé avec EEF1 pour les acide aminés. En effet, en cohérence avec l'esprit de la méthode EEF1, les résidus ionisés doivent se retrouver avec une charge globale nulle or le résidu GLYP (représentant une glycine en position N-terminale ; ce qui est le cas dans FKBP12) possède une charge globale de 1. Cette charge globale a donc été neutralisée en ajustant les charges partielles portées par les différents atomes : l'atome N porte une charge de $-0,6 e$ au lieu de $-0,3 e$, les atomes d'hydrogène qui lui sont liés portent des charges de $0,20 e$ au lieu de $0,33 e$ tandis que les charges de l'atome C^α et des atomes d'hydrogène liés sont nulles alors qu'elles étaient respectivement égales à $0,09 e$ et $0,13 e$ dans la version originale du fichier de topologie. En se basant sur les résultats des simulations LD/EEF1 préliminaires, d'autres ajustements de cette méthode EEF1 ont été nécessaires et seront discutés dans la sous-section 1.2.1. p. 79.

1.2.2. Simulations de dynamique moléculaire aux limites stochastiques ou *Stochastic Boundary Molecular Dynamics, SBD*

La méthode *Stochastic Boundary molecular Dynamics* (SBD) [53, 35] a été imaginée dans le but de limiter le nombre de molécules du solvant contenues dans le système pour des simulations d'un processus localisé dans l'espace, ne faisant intervenir qu'une partie du système [54]. Cette méthode est particulièrement intéressante pour l'étude précise d'une région spécifique d'un système comme par exemple le site d'interaction protéine-ligand. Elle permet, lors des calculs, de ne pas prendre en compte la plupart des atomes n'intervenant pas directement dans le phénomène étudié. Elle est également très utile pour vérifier l'importance de certaines molécules d'eau dans la structure d'une protéine ou d'un complexe sans avoir à inclure de nombreuses molécules n'ayant pas la même importance. La méthode SBD a été maintes fois utilisée pour l'étude de systèmes biologiques et il a été montré qu'elle permet une description correcte des mouvements et interactions intervenant au niveau du site actif [55].

La méthode SBD repose sur un découpage du système en trois régions : réaction, tampon et réservoir (voir figure 2.1). Les atomes de la région de réaction sont soumis à une dynamique classique sans contrainte tandis que les mouvements de ceux de la région tampon sont régis par l'équation de Langevin (équation 2.10)^e. La région réservoir entoure la zone d'interaction (régions tampon et de réaction) et fournit un champ de force statique où les atomes sont contraints, ce qui permet de maintenir les propriétés d'équilibre des atomes de cette zone. Des molécules d'eau^f sont incluses seulement dans la zone d'interaction et peuvent diffuser librement entre les régions de réaction et tampon [35]. Afin d'éviter l'apparition de problèmes liés aux effets de bord, il est nécessaire de définir avec précaution les parties du système contenues dans les différentes régions.

^e. L'espace entre les régions de réaction et tampon doit être assez faible afin d'éviter d'avoir à utiliser un modèle de thermostat sophistiqué.

^f. Pour les simulations SBD, la version de CHARMM du modèle de molécules d'eau TIP3P a été utilisée [41].

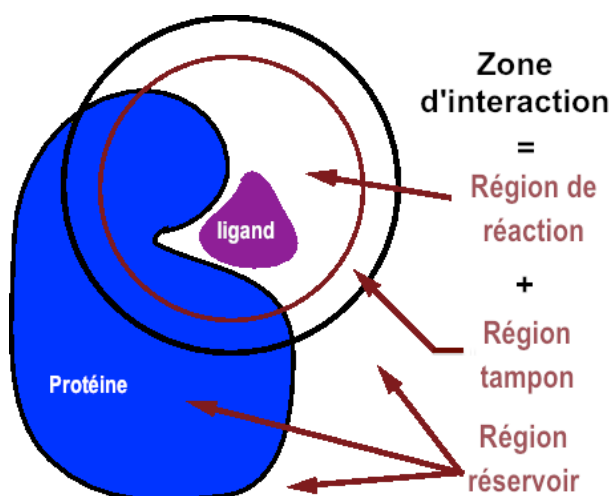


FIGURE 2.1 – Représentation du découpage du système lors des simulations SBD.

1.2.3. Simulations de dynamique moléculaire modifiées par ajout d'une force ou *Biased Molecular Dynamics*, BMD

Les processus biologiques d'intérêt, comme la formation/dissociation de complexe dans les conditions physiologiques, sont associés à des barrières énergétiques relativement élevées. Par conséquent, ils surviennent sur des intervalles de temps de la milliseconde à la seconde, voire la minute [56]. Comme ces intervalles de temps ne sont pas accessibles par des simulations de dynamique moléculaire classique, la force quadratique supplémentaire dépendante du temps implémentée dans la méthode *Biased Molecular Dynamics* (BMD) [36, 37] est introduite afin d'expulser le ligand du site de fixation de la protéine. Dans cette méthode la force dépend du changement d'une coordonnée de réaction (RC) choisie et est introduite dans le système seulement lorsque cette coordonnée de réaction diminue. Contrairement aux autres méthodes, le temps de décomplexation est aléatoire puisque la force n'est pas introduite continuellement, comme attendu lors d'une décomplexation naturelle [37]. De plus, l'introduction de la force implémentée dans la méthode BMD permet d'obtenir une décomplexation qui intervient à travers de mécanismes similaires à ceux observés lors de la décomplexation naturelle, tel que démontré dans l'étude de Curcio *et al.* [57].

2. Calculs de chimie quantique

Afin de déterminer des paramètres pour les ligands **8** et **308** dans le champ de force CHARMM22, des calculs *ab initio* ont été nécessaires pour obtenir les paramètres de référence. Pour le ligand **8**, tous les calculs *ab initio*, *i.e.* HF/3-21G*, HF/6-31G* et MP2/6-31G*//HF/6-31G*, ont été effectués en utilisant le programme Gaussian03 [58], tandis que pour le ligand **308**, les programmes Gaussian03 et GAMESS-US [59] ont été utilisés afin de comparer les résultats obtenus avec ces deux programmes. Afin de construire les fichiers d'entrée nécessaires aux calculs *ab initio*, le programme MOLDEN [60] a été utilisé.

Afin de déterminer les contributions des interactions électroniques à courte distance dans l'état intermédiaire, des calculs d'orbitales moléculaires ont été effectués avec l'hamiltonien PM5 du programme MOZYME disponible dans la version commerciale de MOPAC (MOPAC2006) [61]. Afin de diminuer les temps de calcul, les molécules d'eau ont été remplacées par l'approche continue COSMO [62] en utilisant une constante diélectrique de 78,4.

Chapitre 3

Paramétrisation du champ de force CHARMM22

Au cours du développement des champs de force actuels, de nombreux paramètres ont été définis afin de modéliser les molécules ayant un grand intérêt biologique, telles que les protéines, les acides nucléiques, certains lipides et certains sucres. Cependant, Pranata et Jorgensen ont indiqué qu’une des difficultés majeures de la simulation des complexes protéine-ligand réside dans l’absence de paramètres pour la plupart des ligands, notamment ceux qui sont synthétiques [63]. Afin de surmonter cette difficulté, des outils accessibles en ligne permettent d’obtenir automatiquement, pour de nouvelles molécules, des paramètres compatibles avec ceux développés pour les champs de force utilisés avec le programme CHARMM [64] ^a. Cependant, les développeurs des champs de force conseillent de définir et optimiser des paramètres pour, *i.e.* paramétrer, de nouvelles molécules en utilisant une expertise humaine.

Afin d’obtenir manuellement des paramètres pour de nouvelles molécules qui soient compatibles avec le champ de force CHARMM22, il est nécessaire de suivre une approche identique à celle employée par les développeurs de ce champ de force. De manière générale, la même procédure est utilisée pour le développement des champs de force classiques. Donc, bien que par la suite les procédures détaillées soient tirées de la paramétrisation du champ de force CHARMM22, les étapes principales restent valables pour la plupart des champs de force classiques actuels.

a. www.swissparam.ch/

1. Procédure générale de paramétrisation du champ de force CHARMM22

La procédure de paramétrisation d'une nouvelle molécule dans un champ de force se déroule en quatre étapes principales (voir figure 3.1).

La première étape de la paramétrisation correspond à la recherche des paramètres manquants pour la molécule dans le champ de force CHARMM22. Par exemple, dans la molécule M de la figure 3.1 qui n'a pas été paramétrée dans CHARMM22, il est possible de trouver des groupes qui possèdent des correspondances avec une partie d'une molécule déjà paramétrée. Lors du développement de CHARMM22, les développeurs ont favorisé la possibilité d'utiliser pour le groupe d'atomes CH₂SH des paramètres déjà existants tels que ceux de la chaîne latérale de la cystéine, ceci au détriment de la précision de ces paramètres pour la molécule M entière. Ainsi, il est possible de diminuer le nombre de paramètres à déterminer en utilisant de telles correspondances entre groupes d'atomes. En revanche, la partie HCOCO de la molécule M ne présente aucune correspondance avec une partie d'une molécule déjà paramétrée dans CHARMM22. Il est donc nécessaire de déterminer de nouveaux paramètres pour cette partie.

Cette première étape de la paramétrisation conduit à définir des molécules modèles telles que D de la figure 3.1 qui vont représenter les parties pour lesquelles des correspondances ne peuvent être trouvées. Ces molécules modèles correspondent à des fragments de la molécule de départ dont les parties manquantes sont remplacées par des atomes d'hydrogène ou des groupements méthyle (voir figure 3.1). Cette fragmentation s'effectue de sorte à minimiser la taille des molécules modèles. En fait, plus la taille de la molécule modèle est importante, plus il est difficile d'obtenir des données expérimentales pour l'ensemble de la molécule ou d'effectuer des calculs *ab initio* dans des temps raisonnables (ceux-ci dépendant également des ressources disponibles). Toutefois, selon le niveau de précision souhaité, cette fragmentation ne doit pas se faire au détriment du respect de l'environnement chimique autour des parties pour lesquelles les paramètres doivent être déterminés. Par exemple pour la molécule M, en utilisant la fragmentation présentée sur la figure 3.1, il n'est pas nécessaire de déterminer de nouveaux paramètres pour le terme $E_{\text{interactions liées}}$ pour la partie CH₂-SH, du fait de la correspondance de ce groupe d'atomes avec la chaîne latérale de la cystéine. Toutefois, l'environnement chimique du grou-

1. Recherche des paramètres à déterminer

- Recherche de correspondance
- Définition de molécules modèles

2. Initialisation des nouveaux paramètres

- Assignment des types atomiques
- Attribution des valeurs initiales par analogie

3. Détermination des paramètres de référence

- Calculs au niveau *ab initio* ou mesures sur la structure cristallographique

4. Optimisation des nouveaux paramètres

- Optimisation des paramètres des termes non-liés
- Optimisation des paramètres des termes liés

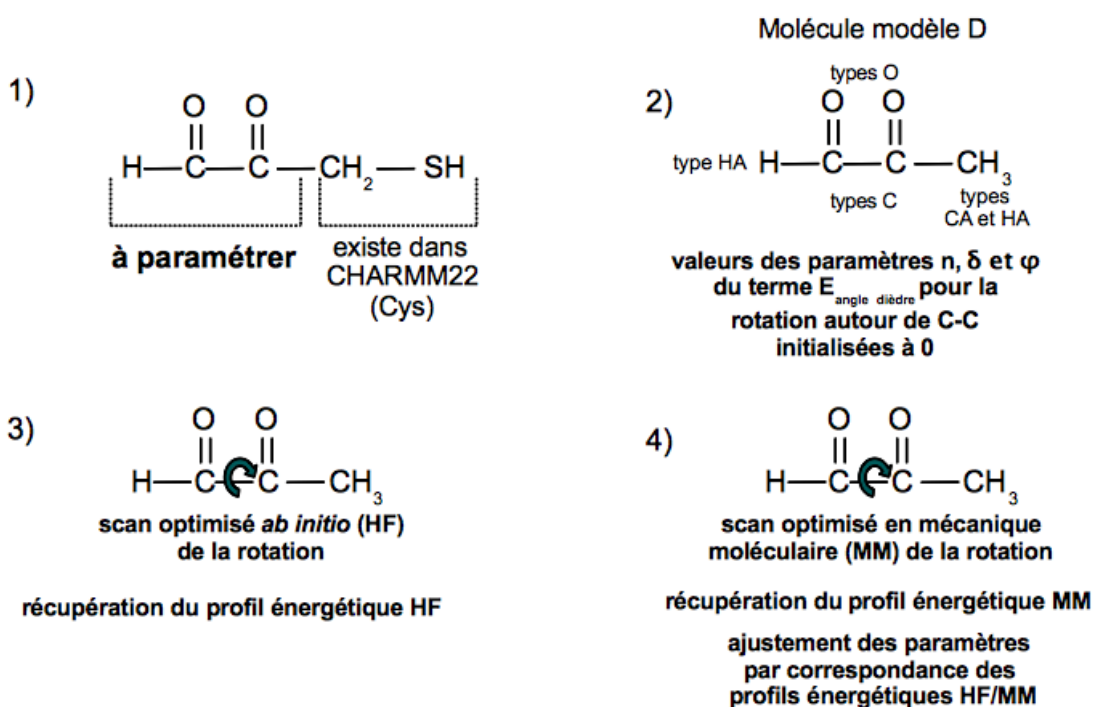


FIGURE 3.1 – Résumé des étapes à suivre lors de la définition de nouveaux paramètres dans CHARMM22 et exemple pour la paramétrisation de la rotation autour de la liaison C-C du β -mercapto- α -céto-propanal (appelé par la suite molécule M).

pement CH_2 est différent dans les deux molécules M et Cys. Cette différence d'environnement chimique a une incidence importante sur les charges partielles des atomes de ce groupement. En effet, dans le cas de M, le groupement CH_2 est lié à une fonction dicétone (électro-attractrice) tandis que dans la cystéine, le groupement CH_2 est lié à un atome de carbone lié à deux autres atomes de carbone et un atome d'hydrogène. Ainsi, afin d'obtenir une meilleure précision pour les charges partielles des atomes de M, il est important d'utiliser la molécule entière afin de déterminer ces charges.

À l'issue de la paramétrisation, les différentes molécules modèles sont fusionnées afin de former la molécule entière [65]. Les paramètres obtenus sont donc parfois ajustés afin de conserver une cohérence entre les molécules modèles et la molécule entière. Par exemple, le groupement méthyle de la molécule modèle D de la figure 3.1 possède un atome d'hydrogène qui remplace le groupement thiol de la molécule M. Afin d'obtenir des paramètres pour l'angle dièdre de rotation entre les deux groupements carbonyle dans D, la charge partielle de cet atome d'hydrogène est fixée à la valeur correspondant à la somme des charges du groupement thiol issues des paramètres connus pour la cystéine.

La deuxième étape correspond à l'initialisation des nouveaux paramètres. Dans le programme CHARMM, afin de définir une molécule, il est nécessaire d'avoir un fichier qui contienne les informations topologiques de cette molécule telles que les types atomiques, leurs charges partielles ainsi que leurs connectivités. Ce fichier peut également contenir des informations sur les groupes d'atomes qui sont accepteurs ou donneurs de liaisons hydrogènes. Par exemple, pour la molécule M, le fichier de topologie contient les types atomiques présentés sur la figure 3.1 avec les charges partielles de ces atomes. Puis, une description complète de la connectivité des atomes est donnée en précisant que les atomes C et O sont liés par une double liaison. De plus, les atomes d'oxygène de la fonction dicétone sont définis comme des accepteurs de liaison hydrogène alors que le groupement thiol est décrit comme donneur de liaison hydrogène. En revanche, le fichier de topologie d'une molécule ne permet pas de décrire les conformations possibles pour cette molécule. Ces conformations dépendent de l'énergie qui est dérivée du champ de force (voir sous-section 1.1. p. 13). Cette énergie est calculée à partir des paramètres qui sont contenus dans un fichier spécifique. Pour les molécules modèles à paramétrer telles que D, les valeurs de certains paramètres du champ de force (le plus souvent r_0 , Θ_0 , n , δ , ϕ_0 , K_ϕ ,

q_i) ne sont pas connues.

Pour l'initialisation des valeurs des paramètres à optimiser, une manière rapide est d'utiliser une valeur contenue dans le champ de force pour un groupement approximativement équivalent, même si les environnements chimiques diffèrent. Par exemple, pour initialiser les valeurs des charges partielles des atomes de la fonction dicétone de M, il est possible d'utiliser les paramètres définis pour le groupement carbonyle de la liaison peptidique. Une autre possibilité pour la sélection des valeurs initiales des paramètres à optimiser est d'utiliser les valeurs expérimentales ou calculées *ab initio* (la méthode dépendant du type de paramètre). Ce type d'initialisation des paramètres est surtout utilisé pour les charges partielles atomiques et pour les paramètres r_0 , Θ_0 et ϕ_0 . Par exemple, il est possible d'initialiser les valeurs des charges partielles atomiques à optimiser en utilisant celles obtenues par une analyse de population de Mulliken [66] réalisée sur la molécule modèle dont la géométrie aura auparavant été optimisée au niveau *ab initio* (*vide infra*).

La troisième étape correspond à la détermination des paramètres de référence. Ces paramètres de référence peuvent être de deux natures en fonction des paramètres qui doivent être optimisés : soit ils proviennent de données expérimentales, soit ils sont calculés *ab initio*. Des exemples de paramètres de référence sont données dans le tableau 1 de la référence [67]. Les paramètres de référence utilisés dans cette étude correspondent soit à des valeurs tirées des structures cristallographiques, soit à des données obtenues par des calculs *ab initio*, effectués principalement avec le niveau de théorie Hartree-Fock [68] et la base d'orbitales atomiques 6-31G* [69] (notée HF/6-31G* ou également HF/6-31G(d) ; pour plus d'informations sur les calculs *ab initio* voir les références [68, 40]). Ces paramètres de référence seront détaillées dans la section 2. p. 35.

La quatrième étape de la paramétrisation, qui se rapporte à l'optimisation des paramètres utilisés dans le champ de force, est présentée dans la sous-section suivante.

1.1. Procédure d'optimisation des nouveaux paramètres pour CHARMM22

La procédure d'optimisation, décrite par MacKerell [67], est un processus itératif qui nécessite la vérification de tous les paramètres après modification de l'un d'entre eux. Lors de la procédure d'optimisation, les paramètres du champ de force sont ajustés de manière à obtenir une convergence des données obtenues par mécanique moléculaire (MM) vers celles de référence. Différents critères de convergence sont utilisés et dépendent du paramètre optimisé (critères présentés dans les sous-section suivantes).

Les procédures d'optimisation de chaque paramètre ainsi que les critères de convergence sont ensuite détaillés.

1.1.1. Optimisation des paramètres de $E_{\text{interactions non-liées}}$

Après l'obtention des géométries initiale et de référence pour les molécules modèles, les premiers paramètres à être optimisés sont ceux des termes $E_{\text{van der Waals}}$ et $E_{\text{électrostatiques}}$. Ces paramètres sont toujours les premiers à être optimisés. Les méthodes utilisées pour optimiser les charges partielles atomiques et les paramètres de van der Waals sont présentées ci-dessous accompagnées des critères de convergence usuels.

Paramétrisation des charges partielles atomiques Afin d'optimiser les valeurs des charges partielles atomiques, deux méthodes sont principalement utilisées [67, 65]. La méthode utilisée dans cette étude repose sur la reproduction en mécanique moléculaire des énergies et distances d'interaction calculées en HF/6-31G* entre une molécule modèle et une molécule d'eau [70, 71]. Pour générer ces énergies d'interaction en HF/6-31G* et en mécanique moléculaire (MM), il est nécessaire de placer une molécule d'eau en interaction avec l'atome dont la charge partielle doit être paramétrée respectivement dans la géométrie de référence et dans la géométrie minimisée^b. L'optimisation de chaque charge partielle atomique étant associée à

^b. La géométrie de référence d'une molécule modèle, utilisée pour déterminer les charges partielles atomiques, correspond à la géométrie de cette molécule optimisée par des calculs *ab initio* (le plus souvent par la méthode HF/6-31G*). Pour les calculs de mécanique moléculaire nécessaires à l'optimisation des charges, la géométrie utilisée correspond à une géométrie de la molécule modèle optimisée par minimisation de l'énergie dérivée du champ de force (appelée géométrie minimisée ici).

l'utilisation d'une molécule d'eau placée en acceptrice ou en donneuse de liaison hydrogène ainsi que l'illustre la figure 3.2 qui superpose deux exemples d'un tel placement. Après le placement initial de la molécule d'eau ($d_{initial}$), l'énergie d'interaction HF/6-31G* entre la molécule d'eau et la molécule modèle est calculée pour chaque valeur de distance de séparation comprise dans un intervalle choisi. Les géométries de la molécule modèle et de la molécule d'eau ne sont pas optimisées durant ces calculs, un scan dit rigide de l'énergie d'interaction est réalisé. À partir du modèle moléculaire équivalent construit en MM, il s'agit ensuite de reproduire la courbe d'énergie d'interaction HF/6-31G*^c, plus particulièrement les valeurs d'énergie et de distance associées au minimum de cette courbe [67].

Afin de pouvoir être utilisé comme profils de référence, les valeurs obtenues par des calculs HF/6-31G* doivent être corrigées. Premièrement, les valeurs d'énergie obtenues pour les espèces non chargées doivent être multipliées par un facteur de 1,16^d. Ce facteur est utilisé pour compenser l'absence de traitement spécifique de la polarisation et conserver un équilibre entre les interactions soluté-solvant et solvant-solvant lors de l'utilisation du modèle d'eau TIP3P [67]^e. Deuxièmement, pour l'interaction entre la molécule d'eau et un site polaire ne portant pas de charge nette, la distance de séparation associée à une énergie minimale ($d_{optimal}$) est diminuée de 0,20 Å. Cette diminution permet de reproduire correctement les propriétés du solvant pur [73] et de tenir compte du manque de traitement explicite de la polarisation ainsi que de l'absence du traitement de la force attractive de dispersion dans la méthode HF [74].

Dans la procédure d'ajustement en MM des charges du modèle moléculaire à partir des courbes issues des scans rigides HF/6-31G* et dont les valeurs $d_{optimal}$ et E_{min} ont été corrigées des facteurs précédents, les critères de convergence entre les deux séries de valeurs qui ont été choisis correspondent à des différences entre les énergies d'interaction HF/6-31G* et MM d'au

c. De ce fait, il est essentiel que le placement de la molécule d'eau soit équivalent pour les deux géométries afin de pouvoir comparer les énergies d'interaction. Pour cela, il est important d'obtenir des géométries minimisées qui sont équivalentes aux géométries de référence pour les molécules modèles.

d. Ce facteur est égal au rapport entre l'énergie d'interaction entre deux molécules d'eau obtenue en utilisant le champ de force CHARMM22 avec le modèle de molécule d'eau TIP3P et la même énergie calculée par la méthode HF/6-31G*.

e. Pour la paramétrisation du champ de force CHARMM22, le modèle TIP3P [72] a été choisi afin de représenter une molécule d'eau.

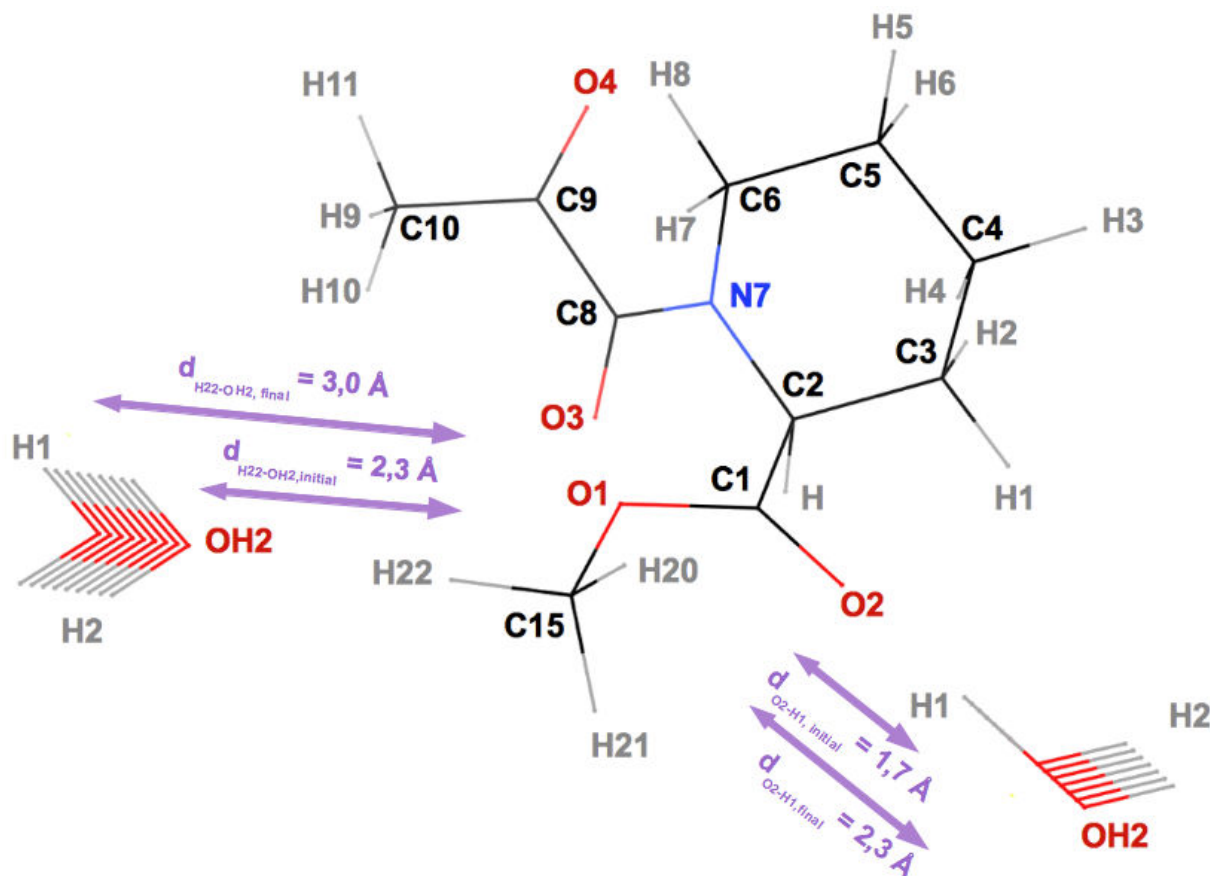


FIGURE 3.2 – Molécule modèle du ligand **8** utilisée pour la paramétrisation des charges partielles des atomes représentés. Deux exemples de placement des molécules d'eau sont représentés. À gauche, le déplacement de la molécule d'eau permet d'effectuer les calculs d'énergie d'interaction conduisant à la paramétrisation des charges partielles pour les atomes **8**-H22 et **8**-C15 (passage de $d_{H22-OH2, initial}$ vers $d_{H22-OH2, final}$ par incrément de distance de 0.05 \AA). À droite, le déplacement de la molécule d'eau permet d'effectuer les calculs d'énergie d'interaction conduisant à la paramétrisation des charges partielles des atomes **8**-O2 et **8**-C1 (passage de $d_{O2-H1, initial}$ vers $d_{O2-H1, final}$ par incrément de distance de 0.02 \AA).

plus 0,2 kcal/mol et entre les distances $d_{optimal}$ HF/6-31G* et MM d'au plus 0,1 Å [73]. Pour accélérer le processus d'optimisation des charges partielles atomiques, il est important de noter que l'énergie d'interaction dépend de la charge partielle de l'atome paramétré mais également de celles de ces atomes voisins qui ont un effet sur les énergies d'interaction calculées, les forces électrostatiques agissant à des distances élevées. Il est donc essentiel d'optimiser de manière concertée les charges partielles des atomes qui sont directement en interaction avec la molécule d'eau et également des atomes dont ils sont proches, notamment ceux auxquels ils sont liés (*e.g.*, les atomes **8**-H22 et **8**-C15 sur la figure 3.2).

Paramètres de van der Waals Les paramètres de van der Waals (ϵ_{ij} et $R_{min,ij}$) sont les plus difficiles à optimiser. Cependant, dans la plupart des cas, l'utilisation de correspondance avec des atomes dont les paramètres sont déjà inclus dans le champ de force permet d'obtenir des résultats satisfaisants. De plus, il est assez rare de trouver des molécules pour lesquelles il n'existe aucune similarité de type atomique avec ceux déjà paramétrés (*e.g.*, atome de carbone aliphatique, aromatique, atome d'oxygène d'un groupement carbonyle, *etc*). Pour cette raison, les méthodes permettant d'optimiser ces paramètres n'ont pas été utilisées dans notre étude. Cependant, des présentations détaillées peuvent être trouvées dans la littérature [75, 76].

1.1.2. Optimisation des paramètres de $E_{interactions\ liées}$

Les paramètres utilisés dans les termes $E_{liaisons\ covalentes}$, $E_{angles\ de\ valence}$, $E_{Urey-Bradley}$, $E_{angles\ dièdres}$ et $E_{angles\ dièdres\ impropres}$ (équations 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 et 2.6 pp. 14-16) sont découpés en deux types. Le premier type correspond aux valeurs obtenues pour un état d'équilibre (obtenues lorsqu'aucune force n'est appliquée ; r_0 , Θ_0 , UB_0 , n et δ , et ϕ_0). Les valeurs optimisées de ces paramètres sont souvent obtenues à partir des valeurs mesurées soit sur la molécule modèle ou la molécule entière optimisée en HF/6-31G*, soit sur la molécule entière caractérisée expérimentalement. Le deuxième type regroupe les constantes de force qui contrôlent les fluctuations autour des valeurs d'équilibre (K_r , K_Θ , K_{UB} , et K_{imp}) ou participent aux barrières énergétiques qui sont associées à des rotations autour d'une liaison covalente et qui séparent les conformations d'énergie minimale (K_ϕ). Lors de la paramétrisation, les paramètres K_ϕ sont ceux qui sont optimisés avec le plus d'attention.

Optimisation des paramètres pour les liaisons covalentes et les angles de valence L'optimisation des paramètres utilisés pour les liaisons covalentes et les angles de valence est en général basée sur la reproduction de spectres vibrationnels [77]. Cependant, la plupart des valeurs de K_r , K_Θ et K_{imp} ont été obtenues par analogie et les paramètres d'équilibre r_0 , Θ_0 et UB_0 ont été définies par analogies ou mesurées sur la géométrie optimisée du ligand en HF/6-31G*. Toutefois, dans notre étude, lorsque des paramètres ont dû être optimisés pour deux angles de valence du ligand **308** (voir sous-section 2.4.2. p. 54), des scans ont été effectués afin de calculer l'énergie potentielle en fonction de la variation d'un angle de valence. Pour les paramètres des angles de valence de **308**, les valeurs d'équilibre Θ_0 ont d'abord optimisées puis les constantes de force K_Θ ont été ajustées.

Paramétrisation des angles dièdres Les angles dièdres sont découpés en deux types principaux : les angles dièdres classiques et les angles dièdres impropres (voir sous-section 1.1. p. 13). La paramétrisation de ces deux types d'angle dièdre repose donc sur deux concepts différents.

Paramétrisation des angles dièdres classiques Afin d'optimiser les paramètres du terme $E_{\text{angles dièdres}}$, il est nécessaire de générer des scans optimisés des angles dièdres classiques à la fois par calculs HF/6-31G* et MM. Ces scans optimisés correspondent à une optimisation complète de la structure du modèle utilisé après chaque incrément de la valeur fixée de l'angle dièdre de rotation autour de la liaison à paramétrer. À l'issue de chaque optimisation de la molécule modèle pour des valeurs d'angle comprises dans un intervalle choisi, une valeur d'énergie potentielle est obtenue ce qui permet de tracer un profil d'énergie de conformation en fonction de l'angle^f.

Les paramètres du terme $E_{\text{angles dièdres}}$ sont optimisés en reproduisant en MM le profil d'énergie de conformation HF/6-31G*. Afin de commencer l'optimisation des paramètres pour $E_{\text{angles dièdres}}$, les valeurs initiales de phase et de multiplicité (respectivement δ et n ; équation 2.5 p. 15) doivent être assignées aux valeurs appropriées au type de liaison covalente autour de laquelle la rotation s'effectue. De plus, pour faciliter et accélérer l'optimisation, il est nécessaire au départ de n'utiliser qu'un seul terme pour $E_{\text{angles dièdres}}$ (voir la possibilité d'amélioration de ce terme par des séries de Fourier dans la sous-section 1.1. p. 15).

^f. Bien qu'en général il soit nécessaire d'effectuer la rotation autour d'une liaison covalente sur 360°, pour les parties présentant une symétrie de rotation il est possible de limiter cette rotation sur 90 ou 180°

Comme précisé par les développeurs des champs de force et dans d'autres études [65, 73], les rotations autour des liaisons covalentes formées entre les différentes sous-parties utilisées lors du découpage du ligand en molécules modèles doivent être traitées avec une très grande attention.

Paramétrisation des angles dièdres impropres Afin d'optimiser les paramètres du terme $E_{\text{angles dièdres impropres}}$, la même méthode que celle décrite précédemment pour les paramètres du terme $E_{\text{angles de valence}}$ peut être utilisée. Toutefois, en règle générale, la recherche de correspondance entre les molécules à paramétrer et celles déjà paramétrées dans le champ de force conduit à l'utilisation de paramètres pré-existants.

Il est important de noter qu'à l'issue de l'optimisation d'un paramètre, chaque paramètre est testé à nouveau afin de vérifier que les critères de convergence sont toujours satisfaits. Dans le cas contraire, les paramètres sont de nouveau optimisés jusqu'à obtenir la convergence souhaitée. Après satisfaction de l'ensemble des critères de convergence, les paramètres sont considérés comme optimisés. Toutefois, il est possible que les critères de convergence choisis ou encore les molécules modèles choisies ne permettent pas d'obtenir des paramètres optimaux pour la molécule entière. Afin de vérifier que les paramètres sont optimaux, une optimisation par minimisation de l'énergie ainsi que des simulations de dynamique moléculaire de la molécule entière sont effectuées en utilisant les paramètres définis. Si les données obtenues après cette optimisation et ces simulations sont équivalentes aux données de référence disponibles pour la molécule (*e.g.*, optimisation HF/6-31G* de la molécule et balayage des valeurs d'angle dièdre correspondant aux profils énergétiques), alors les paramètres sont optimaux. Sinon, les critères de convergence doivent être ajustés ou des molécules modèles de taille plus importante doivent être considérées et une nouvelle procédure d'optimisation doit être effectuée afin d'améliorer la précision des paramètres à déterminer. La nouvelle procédure d'optimisation commence en utilisant comme valeurs initiales pour les paramètres les valeurs qui ont été précédemment déterminés. Ainsi, moins d'itérations sont nécessaires lors de cette nouvelle procédure d'optimisation afin d'atteindre la convergence vers les paramètres géométriques de référence.

2. Paramétrisation du champ de force CHARMM22 pour les ligands 8 et 308

Les ligands **8** et **308** (figure 3.3) comportent des parties pour lesquelles les paramètres nécessaires aux calculs de l'énergie potentielle sont manquants dans le champ de force CHARMM22^g. Afin de pouvoir étudier les complexes FKBP12-**8** et FKBP12-**308**, il a donc été nécessaire de paramétrer, *i.e.* définir et optimiser, ces deux ligands en utilisant la procédure décrite par Frollo et MacKerell [79, 67] et détaillée dans le chapitre précédent.

Dans ce chapitre, le choix des molécules modèles utilisées pour définir les nouveaux paramètres est commenté, puis la définition des paramètres est décrite. Ensuite, les résultats de la procédure d'optimisation de ces paramètres sont présentés pour chaque type de contribution à l'énergie potentielle (voir sous-section 1.1. p. 13). Enfin, les résultats des tests de minimisation énergétique qui ont permis de contrôler les géométries des ligands paramétrés sont analysés afin de valider les nouveaux paramètres.

2.1. Recherche des paramètres à déterminer pour les ligands 8 et 308

Dans un premier temps, des équivalences ont été recherchées pour les atomes, les liaisons covalentes, les angles de valence, les angles dièdre et chaque partie du ligand afin de limiter le nombre de paramètres à optimiser.

L'observation des structures des ligands **8** et **308** permet de faire ressortir un découpage en quatre parties de chaque ligand (figure 3.3). Ces deux ligands possèdent une partie centrale, appelée cœur et trois parties périphériques. Pour le ligand **8**, les parties périphériques corres-

g. Pour le ligand **8**, des paramètres utilisables avec CHARMM22 peuvent être trouvés dans la *Ligand-Protein DataBase* (LPDB) [78]. Toutefois, ces paramètres sont issus d'une assignation automatique des paramètres de **8**. Ces paramètres sont *a priori* peu fiables puisque lorsqu'ils sont utilisés intégralement, nous avons pu voir qu'ils ne permettaient pas d'obtenir des simulations du complexe FKBP12-**8** en accord avec les données expérimentales. Toutefois, dans certains cas ces paramètres ont servi soit à compléter, soit à se substituer aux paramètres pré-définis dans CHARMM22 lorsque ceux-ci semblaient inappropriés, soit de paramètres initiaux pour la définition des nouveaux paramètres

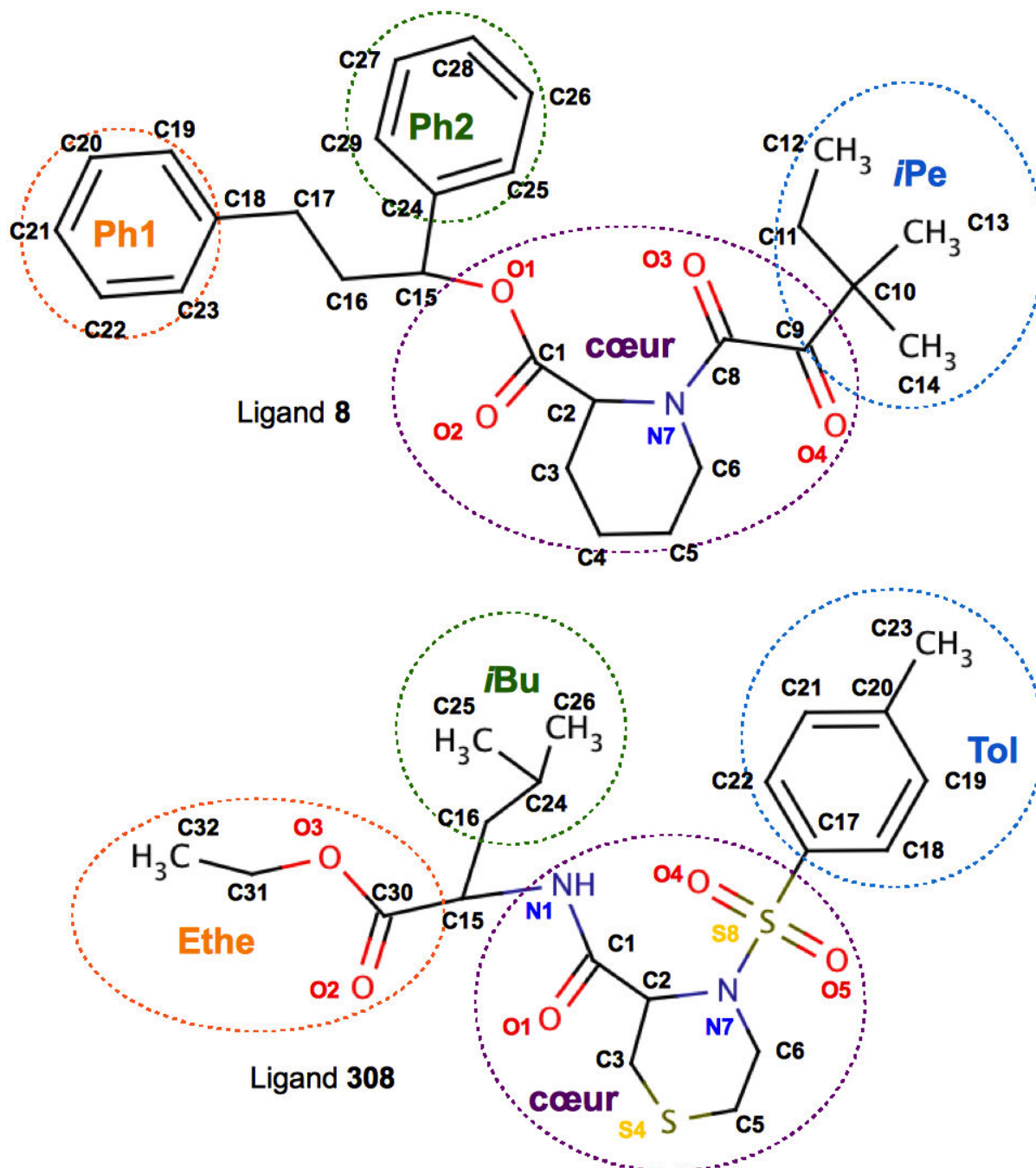


FIGURE 3.3 – Découpage des structures des ligands 8 et 308 en quatre parties. Les parties des ligands 8 et 308 entourées par la même couleur sont équivalentes lors d'un alignement des deux ligands.

pondent à Ph1 par une chaîne aliphatique, Ph2 et *i*Pe ou pour le ligand **308**, à Ethe, *i*Bu et Tol^h. À partir de ces découpages, des correspondances apparaissent entre les parties périphériques et des molécules déjà paramétrées dans CHARMM22. Par exemple, la partie *i*Bu de **308** correspond à la chaîne latérale de la leucine (figure 3.4 B). Les correspondances trouvées pour les deux ligands sont présentées sur la figure 3.4. Pour la partie de cœur, il est possible de voir que les correspondances ne sont pas aussi directes que pour les parties périphériques. De même, pour la partie *i*Pe de **8** la correspondance n'est pas exacte (figure 3.4 A). Ainsi, il est nécessaire d'expliquer les raisons qui nous ont conduits à utiliser malgré tout ces correspondances ou à nous en inspirer pour certains paramètres, notamment les paramètres des termes $E_{\text{van der Waals}}$, $E_{\text{liaisons covalentes}}$, $E_{\text{angle de valence}}$ et $E_{\text{Urey-Bradley}}$.

2.1.1. Paramètres pour $E_{\text{van der Waals}}$

Les ligands **8** et **308** (figure 3.4) ne possèdent que six atomes (respectivement **8**-C9, **8**-C10 et **8**-C15, et **308**-N7, **308**-S8 et **308**-C17) n'ayant pas de correspondance de type atomique dans CHARMM22. Pour les autres atomes de **8** et **308**, les paramètres ϵ_i et $R_{\text{min},i}$ (équation 2.8 p. 17) ont été copiés sur les paramètres des types atomiques déjà existants. Lors de l'optimisation des paramètres de $E_{\text{interactions liées}}$, afin d'éviter de modifier des paramètres pré-existants dans CHARMM22, il a parfois été nécessaire de définir de nouveaux types atomiques même lorsque les correspondances sont satisfaisantes (ceci permet notamment d'éviter des conflits lors de la paramétrisation des angles dièdres). Les nouveaux types atomiques définis pour les deux ligands ainsi que leurs correspondances avec les types atomiques déjà présents dans CHARMM22 sont décrits dans le tableau p. 196 en Annexes. Les types atomiques des atomes **8**-C9, **8**-C10, **8**-C15, **308**-N7, **308**-S8 et **308**-C17 se trouvent parmi ces nouveaux types atomiques. Les correspondances choisies pour les paramètres du terme $E_{\text{van der Waals}}$ de ces six atomes sont expliquées par la suite.

Ligand 8 Parmi les atomes de **8** qui possèdent des correspondances dans CHARMM22, seul le type atomique OS pour l'atome **8**-O1 a été ajusté. Le type atomique OS de CHARMM22 (défini pour certains atomes d'oxygène liés à deux atomes de carbone ; figure 3.4) ne contient

^h. Lors d'un alignement des structures cristallographiques des deux ligands tirées des complexes FKBP12-**8** et FKBP12-**308**, les parties Ph1 et Ethe, Ph2 et *i*Bu, et *i*Pe et Tol sont alignées.

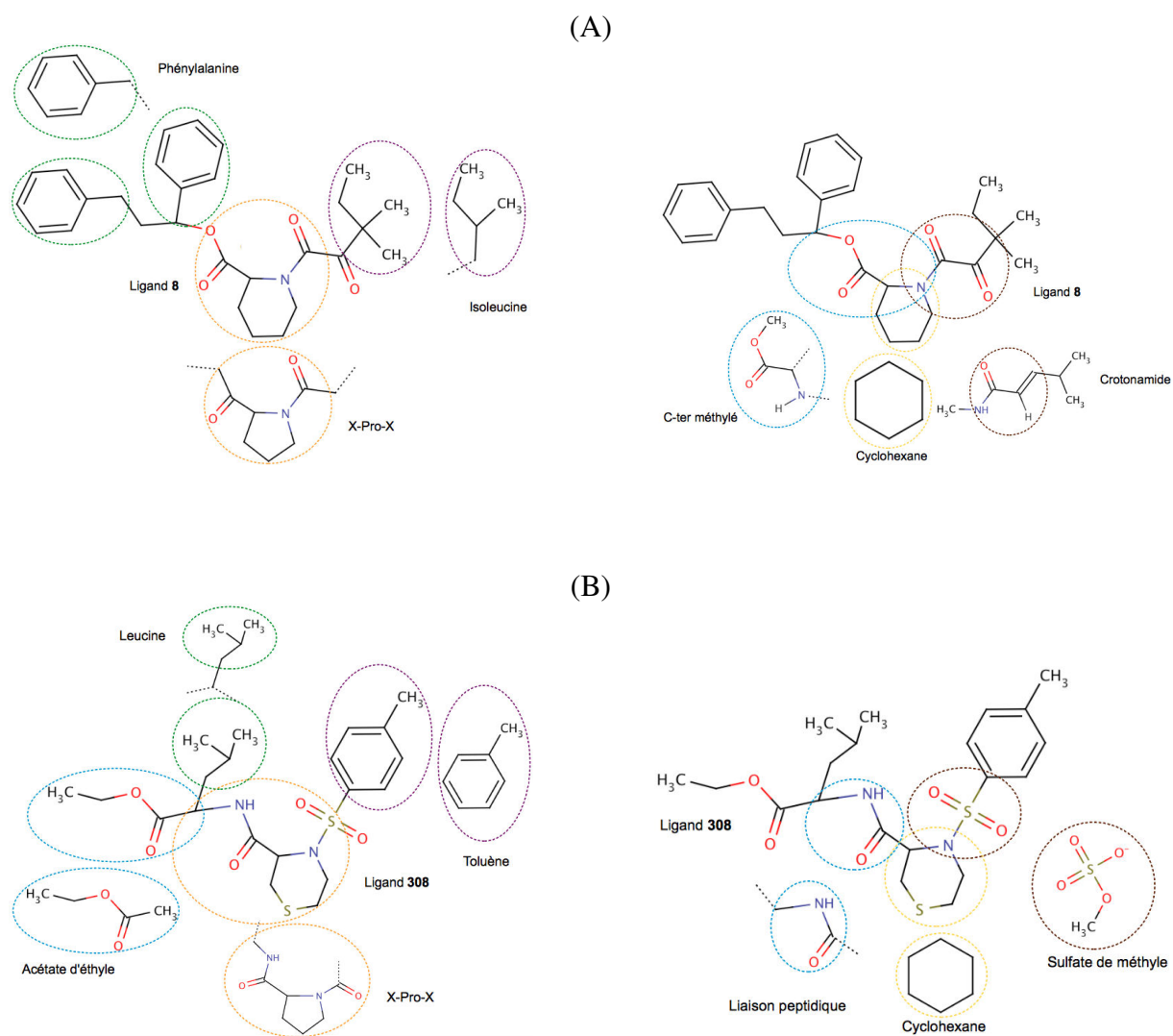


FIGURE 3.4 – Structures des ligands **8** (A) et **308** (B) accompagnées des structures des molécules déjà paramétrées dans CHARMM22 présentant des correspondances avec des parties de ces ligands.

pas de paramètres spécifiques pour les interactions de type 1-4 (formées entre deux atomes séparés par trois liaisons covalentes). Les paramètres spécifiques pour les interactions de type 1-4 (ϵ_i 1-4 et $R_{min,i}$ 1-4) tirés du type atomique OS trouvé dans la LPDB [78] pour le ligand **8** ont été rajoutés aux paramètres ϵ_i et $R_{min,i}$ du type OS de CHARMM22 pour définir le type atomique de **8**-O1.

Pour l'atome **8**-C10, à notre connaissance, il n'existe aucune correspondance directe ou indirecte. En effet, il n'y a aucune molécule paramétrée dans le champ de force CHARMM22 qui possède un atome de carbone lié à quatre autres atomes de carbone (voir partie *i*Pe figure 3.3). Toutefois, puisque l'atome **8**-C10 est lié à quatre atomes de carbone, sa sphère de van der Waals est presque complètement masquée par les sphères de van der Waals des atomes auxquels il est lié. Ainsi, la contribution de l'atome **8**-C10 aux interactions de van der Waals peut être considérée comme négligeable. Les paramètres ϵ_i et $R_{min,i}$ choisis pour l'atome **8**-C10 sont ceux du type atomique CT1 de CHARMM22 (atome de carbone lié à trois atomes de carbone et à un hydrogène)ⁱ.

L'atome **8**-C15 peut être considéré comme un atome de type CT1 dans CHARMM22. Ce type atomique est notamment employé pour les atomes de carbone lié à trois atomes de carbone et à un atome d'oxygène et possède une définition englobant plusieurs environnements chimiques. Ainsi, malgré un environnement chimique différent, le type atomique CT1 utilisé pour l'atome de carbone C $^\alpha$ du résidu phénylalanine a été utilisé pour dériver le type atomique COC pour l'atome **8**-C15. De même, les paramètres du type atomique NR de l'atome **8**-N7 ont été copiés sur ceux du type atomique N utilisé pour l'atome d'azote du résidu proline. De la même manière, l'atome **8**-C9 peut être considéré comme un atome de type C dans CHARMM22 puisque ce type est utilisé pour certains atomes de carbone liés par une double liaison à un atome d'oxygène présents dans des environnements chimiques variés^j.

Ligand 308 Pour **308**, il est intéressant de noter que contrairement à ce qui a été fait pour l'atome **8**-O1 (*vide supra*), les paramètres du type atomique OS pour **308**-O3 ont directement

i. Le type d'atome CT0 a été défini afin de représenter des atomes liés à quatre atomes de carbone comme l'atome **8**-C10.

j. Les types atomiques COS et COC (copiés sur les types CT1 et C) ont été introduits dans CHARMM22 pour les atomes respectifs **8**-C15 et **8**-C8/C9 afin d'éviter de modifier des paramètres pré-existants, notamment pour le terme $E_{\text{angles dièdres}}$.

été tirés de paramètres définis dans CHARMM22 pour l'acétate d'éthyle. Le type atomique O2L (utilisé dans CHARMM22 pour les atomes d'oxygène du sulfate de méthyle) des atomes équivalents **308-O4** et **308-O5** a été modifié afin de rajouter des paramètres pour les interactions 1-4 tels qu'utilisés pour la plupart des atomes d'oxygène doublement lié à un autre atome. Les paramètres permettant de tenir compte des interactions 1-4 pour le type atomique O de CHARMM22 (identique aux types OB et OBL et utilisé pour certains atomes d'oxygène doublement lié à un atome de carbone) ont été rajoutés aux paramètres ϵ_i et $R_{min,i}$ du type atomique O2L.

Pour l'atome **308-S8**, la correspondance la plus proche est celle avec l'atome de soufre du sulfate de méthyle paramétré dans CHARMM22 (figure 3.4). Toutefois, les degrés d'oxydation de ces deux atomes de soufre diffèrent puisque le premier est contenu dans une fonction sulfonamide tandis que le second est présent dans un groupement sulfate. La comparaison des paramètres des types atomiques S, SS et SL de CHARMM22 (respectivement utilisés pour les atomes de soufre trouvés dans la méthionine, les thiolates et les sulfates) montre des différences maximales entre chaque couple de 0,02 kcal/mol et 0,2 Å respectivement pour ϵ_i et $R_{min,i}$. Ainsi, il semble raisonnable d'utiliser les paramètres de l'atome de soufre du sulfate de méthyle pour définir l'atome **308-S8** dans CHARMM22.

Comme observé précédemment sur plusieurs cas, les paramètres de van der Waals semblent très peu dépendants de l'environnement dans lequel se trouve l'atome considéré (*vide supra*). Ainsi, il est possible d'approximer les paramètres des atomes **308-N7** et **308-C17** en utilisant les paramètres définis respectivement pour l'atome d'azote de la proline et pour l'atome de carbone C γ du cycle aromatique de la phénylalanine.

2.1.2. Paramètres pour $E_{\text{électrostatiques}}$

Dans CHARMM22, les charges partielles étant fixes, elles permettent, conjointement aux paramètres de van der Waals, de définir un atome dans un environnement chimique précis. De plus, les charges partielles atomiques dépendent de la géométrie d'une molécule et diffèrent pour deux molécules ayant des géométries même légèrement différentes (*e.g.*, différences de charge partielles atomiques pour les cycles non-aromatiques à cinq et six atomes de carbone). Ainsi, lorsque cela a été possible, la correspondance des environnements chimiques et des géométries entre des parties ou sous-parties des ligands avec des fonctions ou groupements trouvés

dans des molécules déjà paramétrées a été utilisée (voir tableau A.2 p. 197 en Annexes).

Du fait des correspondances seulement partielles des parties de cœur des deux ligands (figure 3.4), les charges des atomes de ces parties ont dû être paramétrées dans les deux cas. Les seules exceptions correspondent aux atomes de la sous-partie N1C1O1 (avec l'atome **308**-H11) pour laquelle la correspondance avec la liaison peptidique est suffisante pour définir leurs charges partielles.

Pour les parties périphériques des deux ligands, malgré leurs correspondances exactes (sauf pour la partie *i*Pe) avec des molécules déjà paramétrées dans CHARMM22, il était important de tenir compte des atomes auxquels elles sont rattachées. En effet, pour la partie Tol de **308**, les charges partielles des atomes **308**-C17, **308**-C18/H18 et **308**-C22/H22 ont dû être paramétrées à cause de leur proximité avec le groupement sulfonyle lié à Tol (figure 3.3 ; voir p. 199 en Annexes pour un détail des différences liées à la présence du groupement sulfonyle). De la même manière, les charges partielles des atome **8**-C15/H20 ont dû être paramétrées à cause des liaisons covalentes formées par **8**-C15 avec la partie Ph2 et la sous-partie O1C1O2 de **8**^k.

Comme l'atome **8**-C15, l'atome **308**-C15 permet de rattacher la partie de cœur de **308** à deux parties périphériques : Ethe et *i*Bu. Toutefois, contrairement à l'atome **8**-C15, la charge partielle de l'atome **308**-C15 n'a pas été paramétrée car cet atome présente un environnement chimique proche de celui observé dans un résidu leucine en position C-terminale dont la fonction acide carboxylique est méthylée.

2.1.3. Paramètres pour $E_{\text{liaisons covalentes}}$

Les liaisons covalentes qui sont trouvées dans les deux ligands sont déjà paramétrées dans CHARMM22, sauf les liaisons covalentes C8-C9 et C9-C10 dans **8**, et C3/C5-S4, N7-S8 et S8-C17 dans **308** (*vide infra*). Les paramètres du terme $E_{\text{liaisons covalentes}}$ pour les deux ligands ont donc été copiés de paramètres existants. Cependant, pour le ligand **308**, les valeurs des paramètres r_0 ont été remplacées par les valeurs des distances de liaison covalente mesurées sur la géométrie optimisée en HF/6-31G*^l, sauf pour la partie *i*Bu (voir tableau A.4 p. 200 en

k. L'atome **8**-C15 permet d'attacher la partie de cœur de **8** aux parties périphériques Ph1 (par le biais du bras propyle C15-C16-C17) et Ph2.

l. Ces modifications ont entraîné une définition de nouveaux types atomiques pour les atomes formant des liaisons covalentes déjà paramétrées afin d'éviter de modifier des paramètres r_0 pré-existants pour les atomes

Annexes).

Ligand 8 Pour la liaison covalente C8-C9, qui se trouve au cœur d'une fonction α -dicétone, aucune correspondance satisfaisante n'a été trouvée dans CHARMM22. Ainsi, les paramètres utilisés pour cette liaison covalente ont été tirés de la LPDB. Pour la liaison covalente C9-C10, en considérant l'atome 8-C10 comme équivalent à l'atome C^β de l'isoleucine, les paramètres K_r et r_0 ont été copiés sur ceux de la liaison covalente C- C^β de l'isoleucine.

Ligand 308 Pour les liaisons covalentes C3/C5-S4, au lieu d'utiliser une correspondance avec la méthionine, le paramètre K_r a été tiré de celui utilisé pour les liaisons covalentes formées entre les atomes de carbone dans le cyclohexane afin de tenir compte de la présence de cette liaison dans un cycle. La valeur de ce paramètre, plus élevée que celle utilisée pour la liaison covalente formée entre les atomes C^γ et S dans la méthionine, est proche de celle trouvée pour les liaisons covalentes formées entre les atomes de carbone du noyau pyrrolidine de la proline (respectivement 229,63, 198 et 222,5 kcal/mol/Å² respectivement pour C3/C5-S4, C^γ -S dans la méthionine et par exemple C^β - C^γ dans la proline).

Pour les liaisons covalentes N7-S8 et S8-C17, puisque les atomes **308**-N7 et **308**-C17 sont tous les deux liés à un groupement sulfonyle, la même logique a été suivie. Les paramètres K_r utilisés ont été tirés de ceux employés pour les liaisons covalentes simples formées entre le soufre et l'oxygène dans le sulfate de méthyle. La différence de la composition atomique de ces trois liaisons est prise en compte dans le paramètre r_0 (1,659 ; 1,766 ; 1,575 Å respectivement pour les liaisons covalentes S-O, S-C, et S-N).

2.1.4. Paramètres pour $E_{\text{angles de valence}}$ et $E_{\text{Urey-Bradley}}$

Pour les paramètres permettant de définir les angles de valence, comprenant les paramètres des termes $E_{\text{angles de valence}}$ et $E_{\text{Urey-Bradley}}$, la même démarche que pour les paramètres des liaisons covalentes a été utilisée. Ainsi, la plupart des paramètres ont été transférés à partir de paramètres existants dans CHARMM22 (voir tableau A.5 p. 201 en Annexes). Toutefois, excepté pour les angles dièdres des parties Ph1-C17 et Ph2 de **8** et *i*Bu de **308**, les valeurs du paramètre Θ_0 ont été tirées des valeurs d'angle de valence mesurées dans la géométrie du ligand optimisée en HF/6-31G*. Lorsque les correspondances ne sont pas exactes (*e.g.*, pour les parties de cœur), les originaux de CHARMM22.

choix effectués sont commentés dans la suite. De plus, l'absence de correspondance satisfaisante pour les angles de valence $C3 - \widehat{S4} - C5$ et $N7 - \widehat{S8} - C17$ du ligand **308** avec les molécules incluses dans CHARMM22 a conduit à la détermination de nouveaux paramètres.

Ligand 8 Aucune correspondance exacte n'a été trouvée dans CHARMM22 pour les angles de valence $C8 - \widehat{C9} - O4$, $C8 - \widehat{C9} - C10$, $O3 - \widehat{C8} - C9$ et $N7 - \widehat{C8} - C9$ (figure 3.4). En revanche, en comparant les paramètres issus de la LPDB avec des paramètres contenus dans CHARMM22 pour des molécules présentant des similitudes avec la fonction α -dicétone, des valeurs équivalentes ont été trouvées. Ainsi, les paramètres K_Θ de la LPDB ont pu être utilisés pour les quatre angles précédents.

De la même manière, bien qu'il y ait des similitudes entre un résidu proline et le cycle pipécolinyle C2N7, les paramètres K_Θ des angles de valence $C6 - \widehat{N7} - C2$ et $C1 - \widehat{C2} - H$ ont été pris dans la LPDB afin de tenir compte de la différence de taille de ces cycles. Le paramètre K_Θ de l'angle de valence $N7 - \widehat{C8} - O3$ a également été pris dans la LPDB. En outre, l'absence d'équivalence exacte pour l'angle de valence $H20 - \widehat{C15} - O1$ a conduit à utiliser le paramètre K_Θ trouvé dans la LPDB pour cet angle.

Ligand 308 Les angles de valence du cycle C2SN7 ont été traités de trois manières différentes. Contrairement à ce qui a été fait pour **8**, les paramètres K_Θ des angles de valence formés avec l'atome **308-N7** ont été copiés sur ceux trouvés dans la proline, l'utilisation de cette correspondance ayant été jugée nécessaire pour ce ligand. Afin de tenir compte de la différence entre des cycles non-aromatiques formés de cinq et de six atomes, les paramètres K_Θ pour les angles de valence $C2 - \widehat{C3} - S4$, $H2 - \widehat{C3} - S4$, $H3 - \widehat{C3} - S4$, $S4 - \widehat{C5} - H4$, $S4 - \widehat{C5} - H5$ et $S4 - \widehat{C5} - C6$ ont été copiés sur ceux du cyclohexane. Enfin, la présence de l'atome **308-S4** dans le cycle C2SN7, a conduit à la détermination des paramètres des termes $E_{\text{angles de valence}}$ et $E_{\text{Urey-Bradley}}$ pour l'angle de valence $C3 - \widehat{S4} - C5$.

Pour la fonction sulfonamide, sa relative correspondance avec le sulfate de méthyle (figure 3.4) permet une approximation satisfaisante de ses angles de valence formés par les atomes **308-O4/O5** et **308-S8** avec les atomes voisins. Toutefois, pour cette fonction, afin de modéliser plus précisément la substitution de deux atomes d'oxygène du sulfate de méthyle par les atomes **308-N7** et **308-C17**, les paramètres du terme $E_{\text{angles de valence}}^m$ pour l'angle de valence

m. Pour l'optimisation des paramètres de l'angle de valence $N7 - \widehat{S8} - C17$, l'introduction du terme

$N7 - \widehat{S8} - C17$ ont été déterminés.

2.1.5. Paramètres pour $E_{\text{angles dièdres}}$ et $E_{\text{angles dièdres impropres}}$

En utilisant les correspondances avec les molécules présentées sur la figure 3.4, les paramètres des angles dièdres trouvés dans les parties ou sous-parties Ph1, Ph2, O1C1O2 et *i*Pe de **8** et *i*Bu, N1C1O1 et Tol de **308**, ont été copiés sur des paramètres existants dans CHARMM22 (tableaux A.6 p. 203 et A.7 p. 205 en Annexes).

Pour les autres parties et les angles dièdres correspondant aux rotations autour des liaisons covalentes formées entre les différentes sous-parties de chaque ligand (*e.g.*, C15-O1 et C15-N1 respectivement pour les ligands **8** et **308**), les choix qui ont été faits sont détaillés dans la suite. De la même façon, même si les paramètres utilisés pour définir les angles dièdres impropres ont été définis à partir d'équivalence, certains choix nécessitent une explication.

Ligand 8 Les angles dièdres de la sous-partie C2N7 ont également été traités en utilisant des correspondances. Toutefois, les valeurs des paramètres δ ont été calculés à partir des valeurs d'angles dièdres mesurées dans la géométrie du ligand optimisée en HF/6-31G*. Pour ce cycle, les paramètres de l'angle dièdre impropre permettant de maintenir les atomes **8**-C2, **8**-C6, **8**-N7 et **8**-C8 dans un même plan n'ont pas été tirés de ceux trouvés pour l'angle dièdre impropre de la proline dans CHARMM22 puisque la valeur nulle du paramètre K_{impr} dans ce champ de force correspond à une absence d'angle dièdre impropre. Les paramètres ont donc été tirés de ceux utilisés pour les angles dièdres impropres trouvés dans les chaînes latérales des résidus asparagine et glutamine.

Pour les sous-parties C17C16 et C8O3C9O4, les correspondances partielles ne permettent pas de définir les paramètres des angles dièdres classiques. Ainsi, les paramètres du terme $E_{\text{angles dièdres}}$ ont dû être déterminés pour les rotations autour des liaisons covalentes C17-C16 et C8-C9. Pour la sous-partie C8O3C9O4, les correspondances partielles avec la liaison peptidique permettent de définir les angles dièdres impropres permettant de maintenir coplanaires les atomes **8**-N7, **8**-C8, **8**-O3 et **8**-C9 d'une part, et les atomes **8**-C8, **8**-C9, **8**-O4 et **8**-C10 d'autre part.

Pour terminer, il a été nécessaire de paramétrer les angles dièdres qui correspondent aux

$E_{\text{Urey-Bradley}}$ n'a pas été nécessaire.

rotations autour des liaisons covalentes qui rassemblent les différentes sous-parties de **8**. Ainsi, en plus des liaisons C17-C16 et C8-C9, de nouveaux paramètres ont dû être déterminés pour les angles dièdres correspondant aux rotations autour de C16-C15, C24-C15, C15-O1, C1-C2, N7-C8 et C9-C10 (voir les flèches sur la figure 3.5 p. 62).

Ligand 308 Pour la partie EtHe et la sous-partie C2SN7, la plupart des paramètres des angles dièdres peuvent être tirés de correspondance (notamment, pour l'angle dièdre impropre maintenant les atomes **308-O3**, **308-C30**, **308-O2** et **308-C15** dans un même plan). En revanche, les paramètres des angles dièdres correspondant aux rotations autour des liaisons covalentes C31-O3, C3-S4ⁿ ont dû être déterminés.

En plus des rotations autour des liaisons C31-O3 et C3-S4, les paramètres des angles dièdres qui correspondent aux rotations autour de C30-C15, C15-N1, C1-C2, N7-S8 et S8-C17 ont été déterminés (voir les flèches sur la figure 3.5 p. 62).

En complément, pour la sous-partie N1C1O1, contrairement à ce qui se passe pour la liaison peptidique, les angles dièdres impropres ont été définis afin d'éviter que les atomes **308-N1**, **308-C1**, **308-O1** et **308-C2** d'une part et N1-H, **308-C15** et **308-C1** d'autre part soient coplanaires puisque sur la géométrie du ligand optimisée en HF/6-31G*, les valeurs mesurées pour ces angles dièdres sont respectivement égales à $\sim 2^\circ$ et $\sim 8^\circ$. Ces légères différences doivent être prises en compte du fait de leur incidence probable sur les positions des parties périphériques EtHe et *i*Bu. De la même manière, la valeur du paramètre ϕ_0 de l'angle dièdre impropre défini par les atomes **308-C2**, **308-C6**, **308-N7** et **308-S8** est issue de la mesure de cet angle dièdre impropre sur la géométrie du ligand optimisée en HF/6-31G*.

2.1.6. Résumé des nouveaux paramètres déterminés pour les deux ligands

Le tableau 3.1 présente un résumé des paramètres qui ont été déterminés pour les ligands **8** et **308**. Au total, pour **8**, il y a 33 jeux de paramètres qui ont été déterminés : 25 charges partielles atomiques et 8 ensembles de paramètres pour les angles dièdres (un ensemble par angle, mais plusieurs paramètres par ensemble). Pour **308**, il y a 30 jeux de paramètres qui ont été déterminés : 21 charges partielles atomiques, 2 angles de valence, et 7 ensembles de

ⁿ. La rotation autour de la liaison S4-C5 a été paramétrée de manière équivalente la rotation autour de la liaison C3-S4.

TABLEAU 3.1 – Résumé des paramètres à déterminer pour les ligands **8** et **308**

	Ligand 8	Ligand 308
charge partielle	C15, H20, O1, C1, O2, C2, H, C3, H1, H2, C4, H3, H4, C5, H5, H6, C6, H7, H8, N7, C8, O3, C9, O4, C10	C2, H1, C3, H2, H3, S4, C5, H4, H5, C6, H6, H7, N7, S8, O4 O5, C17, C18, H18, C22, H22
angle de valence	∅	$C3 - \widehat{S4} - C5$, $N7 - \widehat{S8} - C17$
rotation autour de la liaison	C17-C16, C16-C15, C24-C15, C15-O1, C2-C1, N7-C8, C8-C9, C9-C10	O3-C31, C30-C15, C15-N1, C2-C1, C3-S4, N7-S8, S8-C17

paramètres pour les angles dièdres.

2.2. Découpage des ligands en molécules modèles

Lors de l'étape de recherche des paramètres à déterminer (première étape du protocole présenté dans la section 1. p. 25 et résumé sur la figure 3.1 p. 26), des fragmentations du ligand en molécules modèles ont été effectuées afin de permettre de générer par des calculs HF/6-31G* les données de référence manquantes permettant d'optimiser les nouveaux paramètres du champ de force (*e.g.*, celles obtenues par des scans optimisés en HF/6-31G*). Ces molécules modèles, présentées sur la figure 3.5, sont également utilisées lors des calculs de mécanique moléculaire nécessaires à l'optimisation des paramètres (voir sous-section 1.1. p. 29).

Sur la figure 3.5, il est possible de remarquer que certaines molécules modèles ne diffèrent que par un seul groupement, comme par exemple les modèles M3085 et M3086. Comme expliqué dans la section 1. p. 25, le choix des groupements contenus dans les molécules modèles doit être effectué en maintenant un équilibre entre la taille de la molécule modèle (qui limite les temps de calcul) et le respect de l'environnement chimique de la partie à paramétrer. Ainsi, la substitution du groupement méthyle terminal de **308**-C32 par un atome d'hydrogène n'entrai-

nant pas de modification importante pour la rotation autour de la liaison C15-N1, le fragment M3085 plus petit que le fragment M3086 a pu être utilisé.

Les molécules modèles M81 et M3081 pour lesquelles les atomes d'hydrogène sont montrés sur la figure 3.5 ont été utilisées pour la paramétrisation des charges partielles des atomes soulignés. Pour la paramétrisation de la charge partielle de l'atome **8**-O1, la structure du modèle M81 a été modifiée en remplaçant le groupement lié à l'atome **8**-N7 par un atome d'hydrogène (modèle M81'). Cette modification permet d'éviter, sans modifier drastiquement l'environnement chimique de cet atome, une collision entre la molécule d'eau et le groupement cétone de **8**-C9 lors du scan en HF/6-31G* ou en MM consistant à éloigner cette molécule de l'atome **8**-O1.

Pour le ligand **308**, les molécules modèles M3082 et M3083 présentent des arcs de cercle représentant respectivement les angles de valence $C3 - \widehat{S4} - C5$ et $N7 - \widehat{S8} - C17$. Sur la figure 3.5, une flèche apparaissant au-dessus d'une liaison covalente désigne l'angle dièdre qui a été paramétré en utilisant la molécule modèle correspondante. Toutefois, pour les rotations autour des liaisons C16-C15 de **8** et C30-C15 de **308**, les conformations des molécules modèles ont dû être modifiées afin de pouvoir obtenir des données permettant la détermination des paramètres. Ainsi, l'optimisation des paramètres de la rotation autour de la liaison C16-C15 a été réalisée sur la molécule modèle M83 de la figure 3.5 pour laquelle la valeur de l'angle dièdre C24-C15-O1-C1 vaut 84° (valeur correspondant au minimum énergétique global pour cet angle dièdre contrairement à la valeur de 144° issue de la structure cristallographique). Ceci permet de modifier la position de l'atome **8**-O2 issue de la structure cristallographique du ligand **8** pour le modèle M83, position qui entraînait l'apparition d'une gêne stérique entre les atomes **8**-C17 et **8**-O2 dans la conformation initiale pour M83 lors du scan optimisé en MM de la rotation autour de la liaison C16-C15. De la même manière, pour obtenir des paramètres optimisés pour la rotation autour de la liaison C30-C15 de **308**, il a été nécessaire d'utiliser les valeurs des angles dièdres C30-C15-N1-C1, N1-C1-C2-N7 et C2-C3-S4-C5 correspondant à un minimum énergétique calculé au niveau HF/6-31G* pour chacun de ces angles (valeurs respectives de -83 , 19 et -53° contre -74 , 4 et -70° dans la structure cristallographique). Ces modifications permettent d'éviter l'apparition d'une gêne stérique entre les atomes **308**-O2 et **308**-O1 ainsi qu'une déformation du cycle C2SN7 lors des scans optimisés de la rotation autour de la liaison

C30-C15.

Pour obtenir les données de référence qui vont permettre l'optimisation des charges partielles des atomes des ligands **8** et **308**, les géométries des molécules modèles M81, M81' et M3081 ont dû être au préalable optimisées en HF/6-31G*.

2.3. Initialisation des paramètres à optimiser

Afin de réduire les temps nécessaires à la procédure d'optimisation des paramètres du champ de force CHARMM22, il est commun de choisir des valeurs initiales pour ces paramètres en utilisant des analogies avec des molécules déjà paramétrées dans CHARMM22 [67, 73, 80]. Ainsi, la plupart des charges partielles atomiques qui ont dû être optimisées ont été initialisées en utilisant des analogies avec les molécules contenues dans CHARMM22. Lorsque l'analogie n'est pas satisfaisante, nous avons utilisé les valeurs de charges partielles atomiques obtenues lors d'une analyse de population de Mulliken [66] sur la géométrie de la molécule modèle optimisée en HF/6-31G*, comme ce fut le cas dans d'autres études [81, 67, 82].

Pour les angles de valence $C3 - \widehat{S4} - C5$ et $N7 - \widehat{S8} - C17$, les paramètres ont été initialisés à partir d'analogie avec les molécules présentées sur la figure 3.4 p. 38. Cependant, aucun paramètre d'Urey-Bradley n'a été inclu initialement par souci de simplification. Pour les paramètres des angles dièdres classiques, puisqu'il est possible d'utiliser des séries de Fourier (voir section 1.1. p. 13), il a d'abord été choisi de ne définir qu'un seul terme. Dans certains cas, les connaissances physico-chimiques des parties à paramétrer (notamment pour les symétries de rotation et les possibilités de rotation autour des liaisons covalentes) ont permis d'obtenir des valeurs initiales pour les paramètres K_Φ et n . Les valeurs de δ ont été calculées à partir des valeurs mesurées sur le profil obtenu du scan optimisé en HF/6-31G*. Dans les autres cas pour lesquels les profils d'énergie en fonction de la rotation autour de la liaison sont plus complexes, les valeurs des paramètres K_Φ ont été initialisées à zéro afin de ne pas tenir compte, dans un premier temps, du terme $E_{\text{angles dièdres}}$. De cette manière, il a été possible d'observer les contributions à l'énergie potentielle des autres énergies (notamment, les contributions de van der Waals et électrostatique entre atomes 1 et 4) et d'optimiser plus précisément dans un deuxième temps les paramètres des angles dièdres.

2.4. Optimisation des nouveaux paramètres

Les paramètres des atomes, angles de valence et angles dièdres classiques présentés dans le tableau 3.1, ont été optimisés par convergence des données calculés par MM vers celles de référence (calculées principalement en HF/6-31G*). Afin de permettre une comparaison directe entre ces deux types de données, les calculs MM nécessaires à l’optimisation des paramètres de CHARMM22 pour les deux ligands ont été effectués dans le vide sans utiliser de limite de distance (cut-off) pour les interactions non-liées. De plus, lorsque des optimisations de géométrie en MM ont été nécessaires, comme pour les scans optimisés, la méthode *Adopted-Basis set Newton-Raphson* (ABNR) a été utilisée, comme préconisé par les développeurs de CHARMM22 [83].

2.4.1. Charges partielles atomiques optimisées

Les valeurs des charges partielles des atomes des deux ligands sont contenues dans le tableau A.2 p. 197 en Annexes. Comme expliqué dans la sous-section 1.1.1. p. 29, les charges partielles des atomes présentés dans les tableaux 3.2 et 3.3 (notamment, les atomes de carbone) ont pu être optimisées en utilisant les énergies d’interaction entre une molécule d’eau et un atome ou une liaison (*e.g.*, l’atome **8-O2** et la liaison C15-H22 de la figure 3.2).

Lors de l’optimisation des charges partielles atomiques, il est important d’obtenir des charges qui soient cohérentes avec celles déjà existantes dans CHARMM22. Par exemple, en analysant le fichier de topologie contenant les charges partielles des atomes des protéines, nous remarquons que les charges des atomes d’hydrogène sont assez proches les unes des autres. Par exemple, les charges des atomes d’hydrogène de groupements aliphatiques sont toutes égales à 0,09. Ainsi, en plus des critères de convergence usuels (voir sous-section 1.1.1. p. 29), nous avons tenté de respecter une homogénéité entre les valeurs paramétrées et les valeurs pré-existantes. De ce fait, dans notre étude (sauf certains cas particuliers), les valeurs des charges partielles atomiques des atomes d’hydrogène ont été choisies égales à $0,09 \pm 0,06 e$. Pour les atomes d’oxygène, la charge partielle doit être proche de $-0,5 \pm 0,1 e$. Pour les atomes d’azote, puisque des valeurs comprises entre $\sim -0,3$ et $\sim -0,5 e$ sont observées dans CHARMM22, une valeur contenue dans cette intervalle est privilégiée. Enfin, pour l’atome **308-S4**, en se basant sur la charge de l’atome de soufre de la méthionine, sa charge partielle a été choisie proche de

TABLEAU 3.2 – Distances (d_{opt} en Å) et énergies (E_{min} en kcal/mol) des interactions optimales entre la molécule d’eau et les atomes dont les noms sont soulignés sur la figure 3.5 (A), calculées HF/6-31G* (HF) ou par mécanique moléculaire (MM). Les valeurs de d_{opt} et E_{min} indiquées pour HF correspondent à celles obtenues après l’application des corrections présentées dans la sous-section 1.1.1. p. 29. Afin de vérifier si les critères de convergence sont respectés, les différences entre les valeurs HF et MM sont également indiquées dans le tableau. Les valeurs de différence qui divergent par rapport aux critères de convergence choisis pour la paramétrisation des charges partielles des atomes de **8** sont indiquées soit par des étoiles, soit en gras (pour des divergences respectives inférieures et supérieures à 0,05 Å ou kcal/mol). Les valeurs de charge (e) paramétrées pour les deux atomes de la liaison sont indiquées. Même si l’atome **8**-N7 n’apparaît pas dans ce tableau, il est important de noter que sa charge de $-0,37 e$ contribue aux énergies d’interaction observées, notamment pour C6-H7/H8, C2-H et C8-O3.

liaison	charge atome1	charge atome2	HF		MM		Différence HF-MM	
			d_{opt}	E_{min}	d_{opt}	E_{min}	Δd_{opt}	ΔE_{min}
C15-H20	0,26	0,01	2,71	-0,97	2,70	-1,21	0,01	0,25
C1-O1	0,84	-0,48	1,97	-1,97	2,27	-1,96	-0,30	-0,01
C1-O2	0,84	-0,52	1,89	-4,89	1,80	-4,66	0,09	-0,23*
C2-H	0,11	0,05	2,70	0,04	2,60	-0,98	0,10	1,02
C3-H1	-0,18	0,09	2,65	-1,28	2,59	-1,05	0,06	-0,23*
C3-H2	-0,18	0,09	2,63	-1,55	2,62	-1,41	0,00	-0,14
C4-H3	-0,18	0,09	2,78	-1,23	2,69	-1,11	0,08	-0,12
C4-H4	-0,18	0,09	2,53	-1,76	2,61	-1,95	-0,08	0,19
C5-H5	-0,20	0,10	2,75	-1,48	2,67	-1,36	0,08	-0,12
C5-H6	-0,20	0,10	2,63	-1,01	2,63	-0,94	0,00	-0,07
C6-H7	-0,09	0,105	2,80	-1,81	2,67	-1,76	0,13*	-0,05
C6-H8	-0,09	0,105	2,75	-0,66	2,63	-1,41	0,12*	0,75
C8-O3	0,45	-0,46	1,85	-5,19	1,79	-5,15	0,06	-0,04
C9-O4	0,44	-0,40	1,91	-4,39	1,83	-4,44	0,08	0,05

TABLEAU 3.3 – Distances (d_{opt} en Å) et énergies (E_{min} en kcal/mol) des interactions optimales, entre la molécule d’eau et les atomes dont les noms sont soulignés sur la figure 3.5 (B), calculées HF/6-31G* (HF) ou par mécanique moléculaire (MM). Les valeurs de d_{opt} et E_{min} indiquées pour HF correspondent à celles obtenues après l’application des corrections présentées dans la sous-section 1.1.1. p. 29. Afin de vérifier si les critères de convergence sont respectés, les différences entre les valeurs HF et MM sont également indiquées dans le tableau. Les valeurs de différence qui divergent de plus de 0,05 Å ou kcal/mol par rapport aux critères de convergence choisis pour la paramétrisation des charges partielles des atomes de **308** sont indiquées par une étoile tandis que celles qui divergent de plus de 1 Å ou kcal/mol sont en gras. Les valeurs de charge (e) paramétrées pour les deux atomes de la liaison sont indiquées. Même si l’atome **308**-N7 n’apparaît pas dans ce tableau, il est important de noter que sa charge de $-0,61 e$ contribue aux énergies d’interaction observées, notamment pour C6-H6/H7, C2-H1 et S8-O4/O5.

liaison	charge atome1	charge atome2	HF		MM		Différence HF-MM	
			d_{opt}	E_{min}	d_{opt}	E_{min}	Δd_{opt}	ΔE_{min}
C2-H1	0,09	0,08	2,40	-1,93	2,50	-2,41	-0,10	0,48
C3-H2	-0,18	0,08	2,45	-1,85	2,59	-1,64	-0,14	-0,21
C3-H3	-0,18	0,16	2,45	-1,16	2,56	-1,09	-0,11	-0,07
C3-S4	-0,18	-0,12	2,70	-1,99	2,42	-1,90	0,28	-0,09
C5-H4	-0,20	0,14	2,40	-1,45	2,58	-1,64	-0,18	0,19
C5-H5	-0,20	0,14	2,55	-2,19	2,57	-2,18	-0,02	-0,01
C6-H6	0,02	0,10	2,70	-1,43	2,58	-2,46	0,12	1,03
C6-H7	0,02	0,08	3,00	-2,77	2,56	-3,14	0,44	0,38
S8-O4	1,70	-0,60	1,90	-4,73	1,78	-4,68	0,12	-0,05
S8-O5	1,70	-0,58	1,88	-4,89	1,78	-4,99	0,10	0,11
C18-H18	-0,03	0,03	2,65	-0,82	2,76	-0,90	-0,11	0,09
C22-H22	-0,03	0,03	2,45	-3,07	2,68	-3,09	-0,23*	0,03

$-0,09 e.$ ^o

Avant de commenter les données d'interaction présentées dans les tableaux 3.2 et 3.3, les géométries initiales utilisées pour le placement des molécules d'eau (sous-section 1.1.1. p. 29) sont comparées. Pour chaque modèle, après un alignement des géométries optimisées en MM sur celles optimisées en HF/6-31G*, des calculs de déviations moyennes des positions atomiques (RMSDs) permettent de constater une faible différence entre ces géométries (valeurs de RMSD de 0,23, 0,35 et 0,24 Å respectivement pour les modèles M81 et M81' de **8** et M3081 de **308**). Ces correspondances peuvent être observées sur les figures 3.6, 3.7 et 3.8 pp. 64-65. Malgré les faibles différences observées pour l'ensemble du fragment, nous remarquons que les positions de certains atomes ne sont pas équivalentes dans les deux géométries (notamment, l'atome **8**-O2 dans le modèle M81' présente une position déviée de près de 1 Å entre les deux géométries). Ainsi, ces différences peuvent conduire, lors des scans HF/6-31G* ou MM, la molécule d'eau à entrer en collision avec une partie éloignée du modèle moléculaire. Pour la paramétrisation de certains atomes, des profils d'énergie d'interaction n'ont pas été utilisés pour cette raison. Dans d'autres cas, la comparaison des scans HF/6-31G* et MM était impossible du fait de ces collisions dans un des deux types de scan.

Par la suite, seules les valeurs MM des tableaux 3.2 et 3.3 et associées à des écarts avec les valeurs HF qui ne correspondent pas aux critères de convergence sont commentées.

Ligand 8 L'analyse des données présentées dans le tableau 3.2 montre que pour la moitié des atomes, les différences entre les valeurs HF/6-31G* et MM de distance (d_{opt}) et d'énergie (E_{min}) pour l'interaction optimale ne dépassent pas respectivement 0,1 Å et 0,2 kcal/mol, ce qui correspond aux critères de convergence choisis. La différence ΔE_{min} reste inférieure à 0,25 kcal/mol pour les atomes **8**-H20, **8**-O2 et **8**-H1 et la différence Δd_{opt} reste proche du critère choisi, avec une valeur de 0,13 Å. Un écart Δd_{opt} de 0,3 Å est observé pour **8**-O1 mais cet atome présente

o. Pour les atomes de carbone, aucune valeur spécifique n'a été privilégiée puisque dans CHARMM22 ces atomes présentent des valeurs de charge variables. Toutefois, lorsque des correspondances partielles existent, les charges ont été optimisées de manière à s'approcher le plus possible des valeurs observées dans les parties similaires des molécules paramétrées dans CHARMM22. Pour l'atome **308**-S8, la différence entre le degré d'oxydation de cet atome de soufre avec celui des autres atomes de soufre trouvés dans CHARMM22 ne permet pas de privilégier une valeur précise.

un très faible écart ΔE_{min} . Une difficulté a été de tenter de reproduire la valeur d'énergie d'interaction de la liaison C2-H qui est légèrement positive. Cette interaction avec l'eau défavorable peut provenir de l'interaction avec les atomes voisins des sous-parties C1O1O2 ou C8O3. Des calculs HF/6-31G* ont été réalisés avec un autre modèle simplifié dans lequel le cycle pipécolinyle C2N7 est lié par son azote à une fonction aldéhyde CHO. L'énergie d'interaction calculée est +0,66 kcal/mol. Ce modèle a été abandonné et celui de la figure 3.6 a finalement été utilisé pour trouver les charges sur les atomes **8**-C2 et **8**-H qui (i) défavorise au mieux cette interaction et (ii) ne conduit pas à une modification importante des charges des atomes voisins de **8**-C2. Une autre différence importante ΔE_{min} est observée pour C6-H8 dans le tableau 3.2. En réalité, le profil d'interaction HF/6-31G* pour C6-H8...H₂O n'a pas été utilisé du fait des collisions avec l'atome **8**-O4 distant. Dans ce cas, la valeur de la charge obtenue pour l'autre atome **8**-H7 porté par **8**-C6 a été utilisée.

Pour terminer, la charge partielle de l'atome **8**-N7 a été ajustée de manière à permettre de satisfaire les critères de convergence pour les interactions entre la molécule d'eau et les atomes voisins **8**-H, **8**-H7, **8**-H8 et **8**-O3 et également, tel qu'indiqué précédemment, le critère d'avoir une charge dans l'intervalle $[-0,5 e; -0,3 e]$. La charge de l'atome **8**-C10 a été choisie non nulle en raison de l'influence de la fonction α -dicétone sur les charges de cet atome. De plus, la charge portée par **8**-C10 a aussi aider à neutraliser la charge globale de **8**. Toutefois, puisque la charge de l'atome **8**-C10 contribue à l'énergie d'interaction entre la molécule d'eau et l'atome voisin **8**-O4, la valeur qui a dû être choisie pour l'atome **8**-C10 n'a pas permis de neutraliser complètement la charge globale pour le ligand **8**. Ainsi, dans le ligand **8**, le déficit de $-0,02 e$ a été introduit dans la charge de l'atome **8**-C11, expliquant la valeur de $-0,20 e$ (tableau A.2 p. 197 en Annexes) pour la charge partielle de cet atome qui avait initialement été choisie comme équivalente à la charge de l'atome C γ de la chaîne latérale de l'isoleucine (voir sous-section 2.1.2. p. 40).

Ligand 308 Les critères de convergence des valeurs MM par rapport aux valeurs HF/6-31G* ont été étendus à 0,20 Å pour d_{opt} et 0,25 kcal/mol pour E_{min} , ce qui a permis d'accélérer la paramétrisation des charges partielles des atomes du ligand **308**.

Comme pour **8**, les données présentées dans le tableau 3.3 montrent que ces interactions MM calculées entre une molécule d'eau et les atomes de **308** satisfont les critères de convergence sauf

pour les interactions associées à des valeurs Δd_{opt} ou ΔE_{min} en caractères gras ou marquées d'un astérisque. Pour la liaison C22-H22, les valeurs de charge issues du paramétrage de la liaison symétrique C18-H18 du cycle aromatique a été utilisée (figure 3.8). La valeur Δd_{opt} pour l'atome **308**-S4 peut provenir du choix effectué pour le placement de la molécule d'eau^p mais aussi du fait de l'absence de correction de la valeur HF/6-31G* de d_{opt} (atome défini plutôt comme polarisable que polaire). Il est à noter que, lors de la paramétrisation des 2- et 4-thiouracile pour le champ de force CHARMM27^q, Sarzyńska et Kuliński ont obtenue une différence de 0,32 Å proche de 0,28 Å obtenue pour **308**-S4, entre les valeurs HF/6-31G* et MM de d_{opt} [80].

Les trois interactions entre la molécule d'eau et les liaisons C2-H1, C6-H6 et C6-H7 de **308** présentent des valeurs MM de E_{min} qui divergent des valeurs HF/6-31G* de $\sim 0,4$ à ~ 1 kcal/mol. Ces divergences s'expliquent par la proximité des atomes **308**-H1, **308**-H6 et **308**-H7 avec respectivement des atomes de S8O4O5, N1C1O1 et Tol de **308**. Ainsi, leur profil d'énergie d'interaction n'a pas été utilisé pour optimiser leur charge et celle des atomes de carbone liés. Les charges sur ces atomes découlent de l'optimisation de celles sur leurs voisins respectifs (C3-H2 ; C3-H3, C4-H4, C5-H5 et S8-O5).

2.4.2. Paramètres optimisés pour les angles de valence

Comme indiqué dans le tableau 3.1 p. 46, les paramètres des angles de valence $\widehat{C3 - S4 - C5}$ et $\widehat{N7 - S8 - C17}$ de **308** ont été optimisés. Dans CHARMM22, les paramètres pour $E_{\text{angles de valence}}$ et $E_{\text{Urey-Bradley}}$ sont définis et optimisés de manière concertée. Les paramètres obtenus après optimisation pour les angles de valence sont présentés dans le tableau 3.4. Ces paramètres ont permis d'obtenir les profils d'énergie potentielle présentés HF/6-31G* et MM en bon accord sur la figure 3.9. Ces deux profils s'alignent presque parfaitement notamment pour les valeurs proches du minimum énergétique. Les différences d'énergie maximales entre les deux profils

^p. La procédure d'optimisation des charges partielles des atomes de soufre n'étant pas détaillée dans la littérature, plusieurs positionnements d'une molécule d'eau par rapport à l'atome **308**-S4 ont été testés. Plusieurs positions pour lesquelles le profil d'énergie d'interaction présente un puits énergétique ont été choisies. Parmi les positions choisies, une seule a permis d'obtenir des énergies calculées en HF/6-31G* et en MM comparables.

^q. Le champ de force CHARMM27 correspond au champ de force CHARMM22 pour lequel des paramètres spécifiques aux acides nucléiques ont été modifiés.

TABLEAU 3.4 – Paramètres optimisés pour les angles de valence du ligand **308**. Les molécules modèles de la figure 3.5 qui ont été utilisées pour l’optimisation de ces paramètres sont également indiqués.

Angle de valence	Molécule modèle	K_{Θ}	Θ_0	K_{UB}	UB_0
$C3 - \widehat{S4} - C5$	M3082	58,35	116,96	11,16	2,56
$N7 - \widehat{S8} - C17$	M3083	70,00	103,50	\emptyset	\emptyset

s’élèvent à 0,9 et 0,03 kcal/mol respectivement pour les angles de valence $C3 - \widehat{S4} - C5$ et $N7 - \widehat{S8} - C17$. Ainsi, pour l’angle $C3 - \widehat{S4} - C5$ malgré l’utilisation d’un terme d’Urey-Bradley (tableau 3.4), il est difficile de reproduire correctement le profil HF/6-31G* observé pour les valeurs d’angle éloignées de la valeur optimale. Toutefois, les valeurs de différences pour les profils HF/6-31G* et MM de l’angle $C3 - \widehat{S4} - C5$ restent inférieures à 0,3 kcal/mol pour des valeurs d’angle contenues dans l’intervalle $[93,8^\circ ; 100,8^\circ]$. En sachant que la variation de l’angle de valence $C3 - \widehat{S4} - C5$ ne peut pas dépasser quelques degrés du fait des contraintes du cycle C2SN7, les paramètres pour cet angle ont été considérés comme acceptables.

2.4.3. Paramètres optimisés pour les angles dièdres

Comme détaillé dans la sous-section 1.1. p. 15, pour chaque angle dièdre à définir, une combinaison de plusieurs termes peut être utilisée afin d’obtenir une représentation plus précise de l’énergie potentielle en fonction de la variation de l’angle. Ainsi, comme présenté dans les tableaux 3.5 et 3.6’, plusieurs termes ont été utilisés pour paramétrer les angles dièdres des ligands **8** et **308**, sauf pour les angles dièdre des liaisons C24-C15 et C9-C10 de **8**. Il est à noter que, pour la rotation autour de la liaison C24-C15, le terme utilisé a été défini avec une valeur négative pour le paramètre K_{Φ} ($-0,065$ kcal/mol). Cette valeur négative indique que ce

r. Seuls les termes qui possèdent un paramètre K_{Φ} différent de zéro sont contenus dans ces tableaux. Cependant, plusieurs angles dièdres correspondent à une rotation autour d’une même liaison covalente. Par exemple, pour la rotation autour de C1-C2, il existe quatre angles dièdres. Parmi ceux-ci, l’angle dièdre O1-C1-C2-N7 a été choisi pour définir les paramètres ce qui veut dire que pour les angles dièdres O1-C1-C2-C3, O2-C1-C2-N7 et O2-C1-C2-C3, les termes pour $E_{\text{angles dièdres}}$ présentent des valeurs nulles pour K_{Φ} .

terme a seulement été utilisé afin de diminuer les contributions des autres interactions dans le champ de force (principalement les interactions de van der Waals et électrostatiques) à l'énergie potentielle, comme expliqué dans la sous-section 1.1. p. 16.

Les paramètres indiqués dans les tableaux 3.5 et 3.6 ont donc permis d'obtenir les profils MM qui ont été alignés sur les profils HF/6-31G*, tel qu'illustré sur les figures 3.10 et 3.11 pp. 67-70. Plus précisément, les paramètres K_{Φ} ont été ajustés par convergence des points selles obtenus en MM sur ceux calculés au niveau MP2/6-31G*//HF/6-31G*. En effet, tous les points selles obtenus en HF ont été recalculés, sans optimisation de géométrie, en MP2 afin d'obtenir des hauteurs de barrière plus précises et, en général, plus faibles que celles calculées en HF/6-31G*. Ces profils sont dans la suite commentés.

Ligand 8 Sur la figure 3.10, pour l'ensemble des minima et maxima, les valeurs d'angle dièdre calculées au niveau HF/6-31G* et les valeurs d'énergie MP2/6-31G*//HF/6-31G* sont correctement reproduits par les profils MM.

Afin de compléter l'optimisation des angles dièdres, pour le ligand **8**, il a été nécessaire de vérifier que les paramètres obtenus permettaient de modéliser le couplage important qui existe entre les deux angles dièdres correspondant aux rotations autour des liaisons C8-C9 et C9-C10. Afin de caractériser ce couplage, un scan bidimensionnel optimisé de la rotation autour de ces deux liaisons a été effectué à partir du modèle M87 (figure 3.5 (A) p. 62) pour quelques valeurs d'angle dièdre^s. Après projection sur un plan de la surface d'énergie potentielle obtenue en fonction des variations des angles N7-C8-C9-C10 et O4-C9-C10-C11, les cartes de profil énergétique au niveau HF/3-21G*^t et calculé par MM sont présentées sur la figure 3.12 p. 71. Ces figures indiquent des profils pour les calculs MM proches de ceux calculés en HF/3-21G*.

^s. Le scan bidimensionnel correspond à l'optimisation de la structure après chaque rotation autour de la liaison covalente C8-C9 par pas de 30° sur 360° en fixant l'angle de torsion autour de la liaison covalente C9-C10 à une valeur correspondant à un point selle. La même procédure est effectuée pour chaque valeur de l'angle de torsion autour de la liaison covalente C9-C10 correspondant à un point selle. Pour compléter le scan bidimensionnel, pour chaque valeur de l'angle de torsion autour de la liaison C8-C9 correspondant à un point selle, la même procédure est utilisée en faisant varier l'angle de torsion autour de la liaison covalente C9-C10 par pas de 30° sur 120° en fixant l'angle de torsion autour de la liaison C8-C9.

^t. Le changement de la base d'orbitale atomique permet d'effectuer les scans bidimensionnels dans des temps de calcul raisonnables.

TABLEAU 3.5 – Paramètres optimisés pour les angles dièdres du ligand **8**. La liaison covalente autour de laquelle s’effectue la rotation est indiquée en gras. Les molécules modèles qui ont été utilisées pour l’optimisation de ces paramètres sont également indiquées (leur structure est présentée sur la figure 3.5 (A)).

angle dièdre	modèle utilisé	K_{Φ}	n	δ
C18-C17-C16-C15	M82	1,720	3	0,0
		0,300	3	80,0
		0,650	1	0,0
		-0,600	2	180,0
		0,400	2	170,0
C17-C16-C15-C24	M83	2,050	3	2,1
		0,300	1	-50,0
		0,150	2	275,0
		0,150	1	160,0
C25-C24-C15-O1	M84	-0,065	2	-89,0
C24-C15-O1-C1	M84	0,270	3	110,0
		-0,220	1	210,0
		0,220	1	80,0
O1-C1-C2-N7	M85	1,150	2	60,0
		0,450	1	200,0
		0,100	3	160,0
C2-N7-C8-O3	M86	12,000	2	-172,2
		0,600	1	200,0
N7-C8-C9-C10	M87	1,200	1	0,0
		2,600	1	20,0
		-0,800	1	70,0
		0,400	3	120,0
O4-C9-C10-C11	M87	0,100	3	73,5

TABLEAU 3.6 – Paramètres optimisés pour les angles dièdres du ligand **308**. La liaison covalente autour de laquelle s’effectue la rotation est indiquée en gras. Les molécules modèles qui ont été utilisées pour l’optimisation de ces paramètres sont également indiquées (leur structure est présentée sur la figure 3.5 (B)).

angle dièdre	modèle utilisé	K_{Φ}	n	δ
C32-C31-O3-C30	M3084	0,30	3	0,0
		0,35	2	0,0
O2-C30-C15-N1	M3086	0,80	3	180,0
		0,80	2	160,0
C16-C15-N1-C1	M3085	0,90	2	-50,0
		-2,50	1	-90,0
		1,10	1	120,0
N1-C1-C2-N7	M3088	0,70	3	300,0
		1,75	2	-140,0
		0,50	2	180,0
		0,50	1	0,0
C2-C3-S4-C5	M3087	3,00	1	80,0
		1,00	1	0,0
C6-N7-S8-C17	M3088	1,20	2	-30,0
		0,40	4	0,0
		1,50	7	-40,0
		0,50	8	40,0
		0,30	10	210,0
N7-S8-C17-C18	M3088	-0,80	2	80,0
		0,80	2	0,0
		0,20	6	180,0
		0,45	8	0,0

Les similitudes des cartes montrent que pour les valeurs d'énergie maximales, les paramètres optimisés pour les deux angles dièdres permettent de reproduire le couplage observé en HF/3-21G*. De plus, les cartes sont similaires pour les valeurs d'énergie minimales, mis à part une inversion entre la valeur d'angle associée au minimum énergétique global et celle associée au minimum énergétique local, qui sont séparés d'environ 2 kcal/mol ($\text{O4-C9-C10-C11} \sim -150 \pm 25^\circ$ et $\text{N7-C8-C9-C10} \sim 150 \pm 50^\circ$ pour minimum global et $\sim -100 \pm 50^\circ$ pour le minimum local). Le scan de l'angle N7-C8-C9-C10 de la figure 3.10 fait apparaître une correspondance correcte entre profils HF/6-31G* et MM pour les minima global ($\sim 236^\circ$) et local (angle $\sim 116^\circ$). Il est possible que l'inversion observée sur les scans bidimensionnels provienne de l'utilisation d'une base d'orbitale atomique moins précise pour les calculs HF.

Les paramètres obtenus pour l'ensemble des angles dièdres de la figure 3.10 permettent de reproduire les calculs de référence. D'autre part, le scan bidimensionnel calculé en HF/3-21G* et reproduit en MM donne une comparaison générale satisfaisante pour l'ensemble des valeurs d'angles et d'énergies balayées par ces deux angles à $T=300\text{ K}$.

Ligand 308 Sur la figure 3.11, en se focalisant principalement sur les profils proches des minima, les profils MM correspondent aux profils HF/6-31G* pour tous les angles. Seul le minimum local pour l'angle autour de la liaison C3-S4 présente des valeurs d'angle qui diffèrent de 15° entre HF/6-31G* et MM ($65,1^\circ$ et $50,1^\circ$). Cependant, la valeur de cet angle dans la structure cristallographique est $-65,3^\circ$. Aussi, ce minimum local ne pourra être atteint étant donné la barrière de $\sim 8\text{ kcal/mol}$ qui ne peut être franchie à 300 K . Ainsi, pour cette rotation l'optimisation des paramètres a été effectuée de manière à reproduire préférentiellement le puits observé aux alentours du minimum à $-54,9^\circ$. La même simplification dans le paramétrage a été utilisée pour les angles dièdres qui présentent des barrières énergétiques, calculées à partir des minima, élevées (supérieures à 5 kcal/mol). Pour les profils de l'angle de la liaison N7-S8 de la figure 3.11, étant donné les barrières MP2/6-31G*//HF/6-31G* importantes, seules les valeurs autour du puits à 247° - 292° (équivalent au puits à 427° - 472°) et proches de la valeur trouvée dans la structure cristallographique ont été reproduites en MM.

Pour l'angle autour de la liaison covalente S8-C17, une attention particulière a été portée à la reproduction de la faible barrière énergétique trouvée entre les minima global et local ($247,7^\circ$ et $292,7^\circ$). La valeur d'énergie associée à cette barrière est seulement de $0,3\text{ Å}$, ce qui traduit une

facilitée de conversion entre l'angle associé au minimum local et l'angle associé au minimum global. Cette transition peut entraîner des changements d'angle de 35° entre les deux minima, voire de 75° puisque les énergies associées aux valeurs $232,7^\circ$ et $307,7^\circ$ sont inférieures à $\sim 0,8$ kcal/mol. Une telle transition peut expliquer la mobilité élevée de la partie Tol de **308**, tel que nous le verrons dans les chapitres suivants.

3. Validation de la paramétrisation

Une première étape de validation a consisté à aligner la géométrie du ligand entier optimisée en MM par la méthode ABNR soit sur la géométrie optimisée en HF/6-31G*, soit sur la géométrie tirée de la structure cristallographique (figure 3.13). Après ces alignements, des calculs de déviations moyennes des positions atomiques (RMSDs) afin de quantifier les déviations des positions atomiques du ligand et de ses parties ont été réalisés.

Sur la figure 3.13 p. 72, les géométries optimisées par MM pour les deux ligands présentent de légères différences avec la géométrie optimisée en HF/6-31G*. La valeur de RMSD correspondante pour l'ensemble des atomes lourds du ligand s'élèvent à 0,63 et 1,28 Å, respectivement pour **8** et **308**. En analysant les RMSD pour les parties du ligand, nous constatons que les déviations les plus importantes sont dues aux parties *i*Pe et *i*Bu respectivement de **8** et **308** (valeurs de RMSD respectivement de 1,2 et 2,2 Å). À l'inverse, les parties de cœur des deux ligands sont celles qui dévient le moins par rapport à la géométrie optimisée en HF/6-31G* (valeurs de RMSD respectivement de $\sim 0,4$ et $\sim 0,7$ Å).

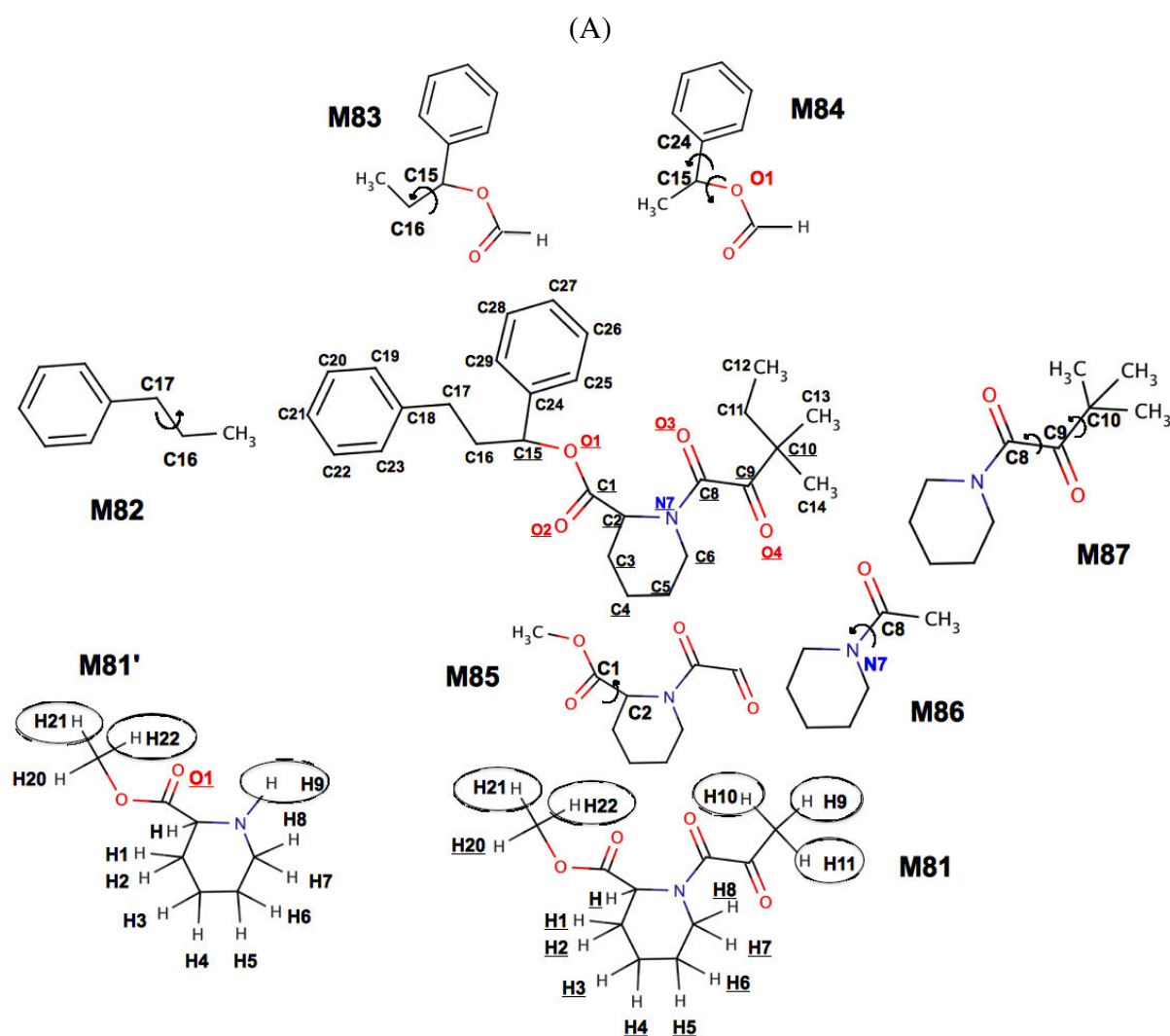
Contrairement à ce qui est observé pour l'alignement précédent, lorsque la géométrie du ligand optimisée en MM est alignée sur la géométrie tirée de la structure cristallographique, les déviations sont plus faibles. Pour les atomes lourds du ligand, les valeurs de RMSD sont égales à $\sim 0,5$ Å dans les deux ligands tandis que les déviations maximales des positions des parties périphériques des ligands sont proches de 0,6 Å (pour Ph1 de **8** et Ethe de **308**).

Contrairement à nos attentes, ces résultats indiquent que les paramètres optimisés pour les deux ligands permettent d'obtenir des géométries qui s'approchent plus des géométries tirées des structures cristallographiques, ceci est particulièrement vrai pour le ligand **308**.

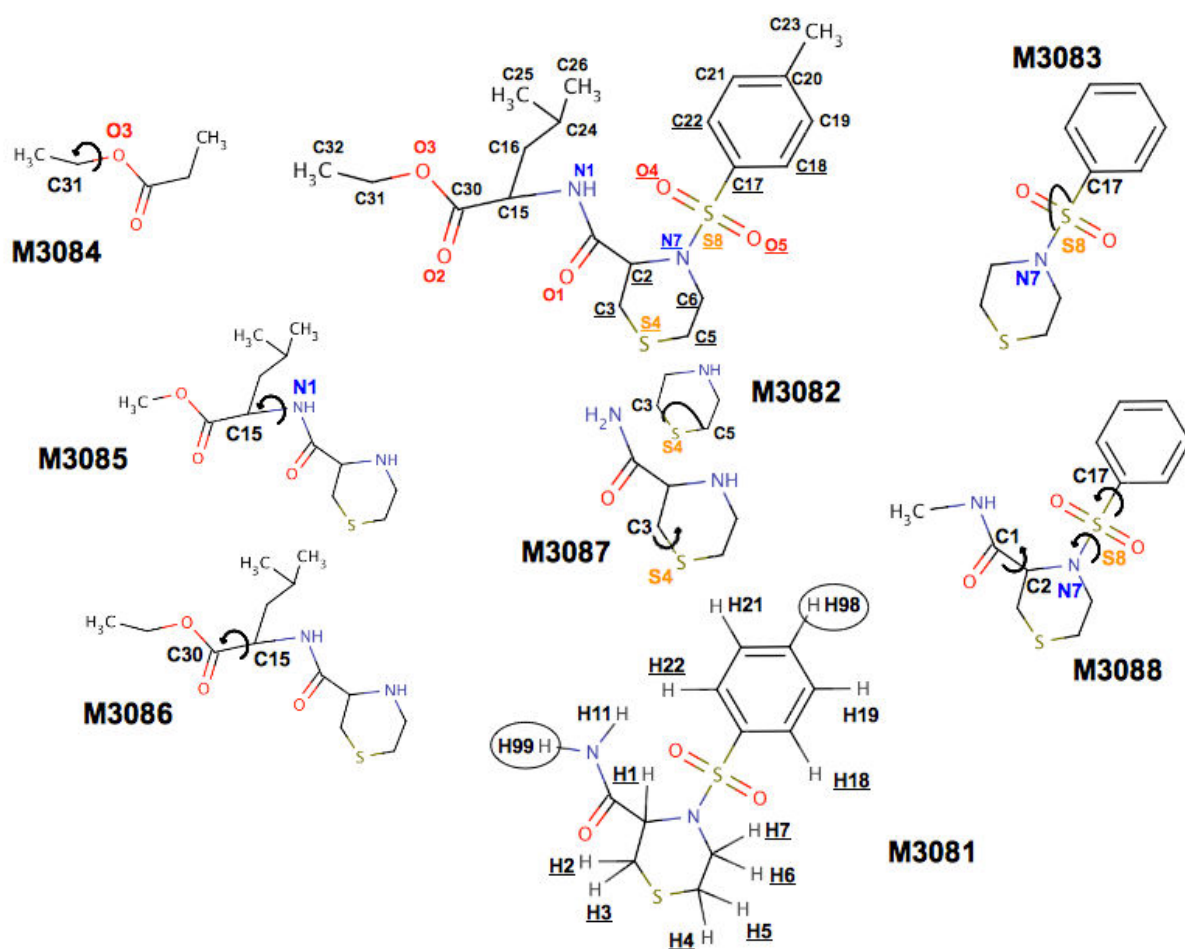
Une deuxième étape de validation a consisté à confronter les données issues des simulations

des complexes FKBP12-**8** et FKBP12-**308** (structure du ligand, sa mobilité, sa position globale dans le site de fixation, ses interactions) à la structure cristallographique correspondante. Tous ces aspects sont présentés dans le chapitre suivant.

FIGURE 3.5 – Structures des molécules modèles de **8** (A) et **308** (B) utilisées pour la détermination des nouveaux paramètres. Pour les molécules modèles M81 et M3081 utilisées pour l’optimisation des charges partielles des atomes soulignés, les atomes d’hydrogène entourés remplacent les parties manquantes du ligand.



(B)



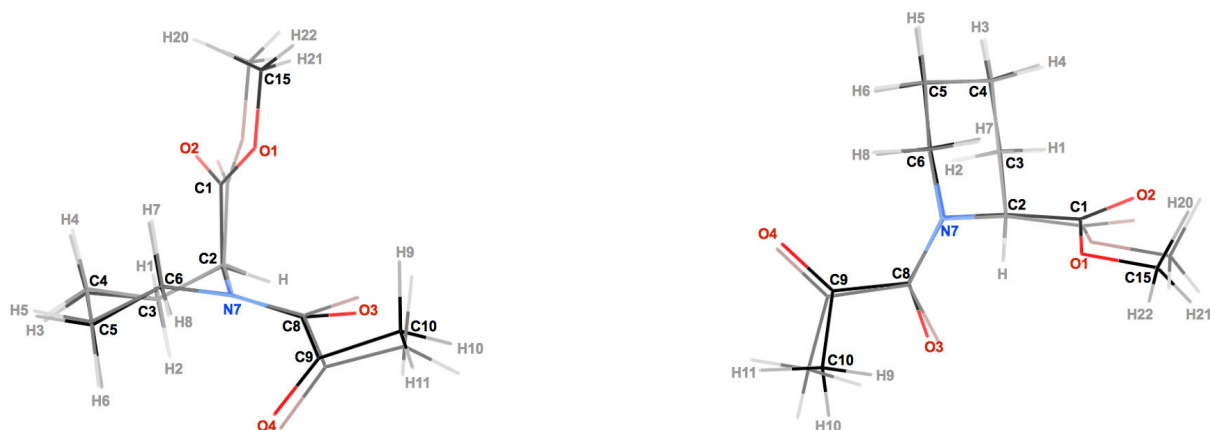


FIGURE 3.6 – Alignement des molécules modèles M81 utilisées pour l’optimisation des charges partielles des atomes de ce modèle pour lequel la numérotation est identique à celle de **8** sauf pour les atomes H9, H10, H11, H21 et H22. Les atomes dont les charges doivent être paramétrées en utilisant le modèle M81 sont soulignés sur la figure 3.5 (A), sauf l’atome **8-O1** (voir figure 3.7). L’alignement des modèles optimisés en HF/6-31G* (foncé) et en MM (clair) est représenté sous deux angles de vue. Seuls les noms des atomes du modèle optimisé en HF/6-31G* ont été représentés pour plus de clarté.

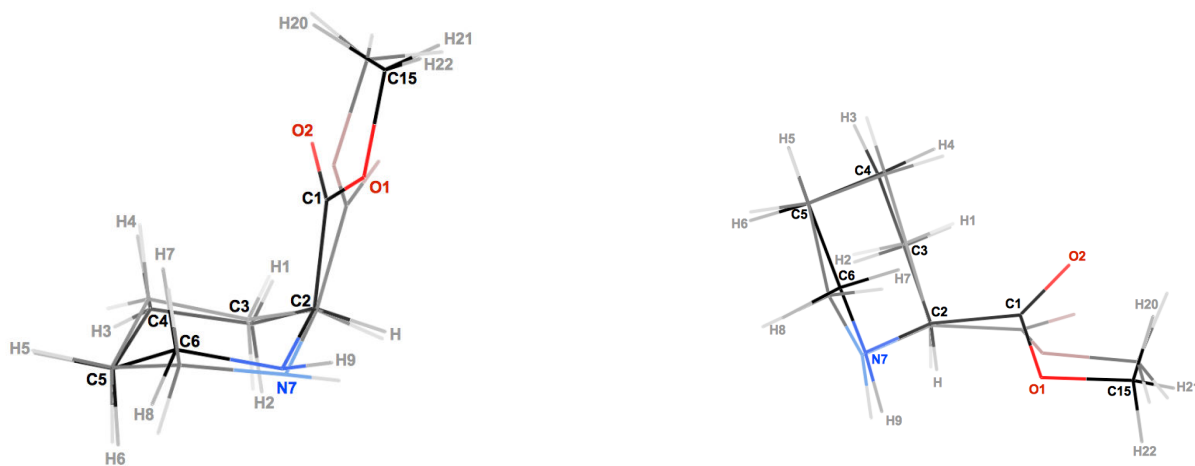


FIGURE 3.7 – Alignement des modèles simplifiés M81’ utilisés pour l’optimisation de la charge partielle de l’atome **8-O1**. L’alignement des modèles optimisés en HF/6-31G* (foncé) et en MM (clair) est représenté sous deux angles de vue. Seuls les noms des atomes du modèle optimisé en HF/6-31G* ont été représentés pour plus de clarté.

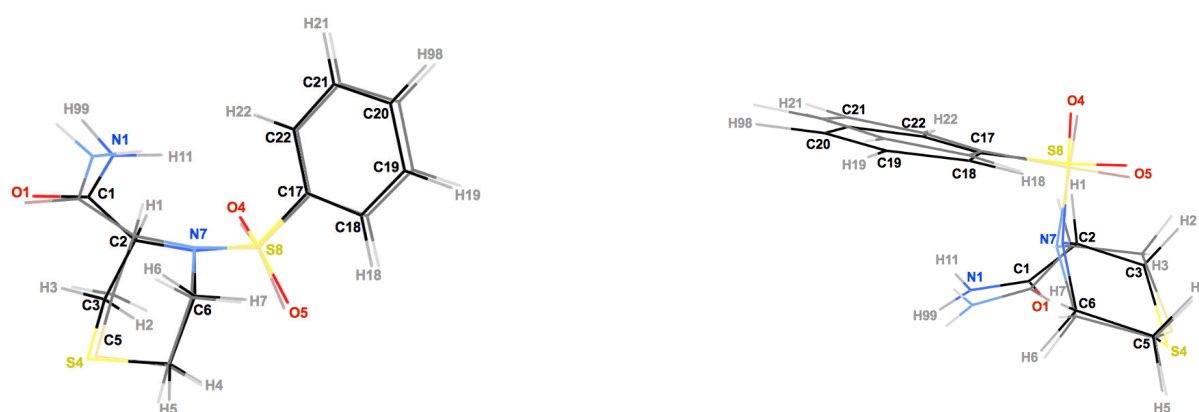


FIGURE 3.8 – Alignement des molécules modèles M3081 utilisées pour l’optimisation des charges partielles des atomes de ce modèle pour lequel la numérotation est identique à celle de **308** sauf pour les atomes H98 et H99. Les atomes dont les charges doivent être paramétrées en utilisant le modèle M3081 sont soulignés sur la figure 3.5 (B). L’alignement des modèles optimisés en HF/6-31G* (foncé) et en MM (clair) est représenté sous deux angles de vue. Seuls les noms des atomes du modèle optimisé en HF/6-31G* ont été représentés pour plus de clarté.

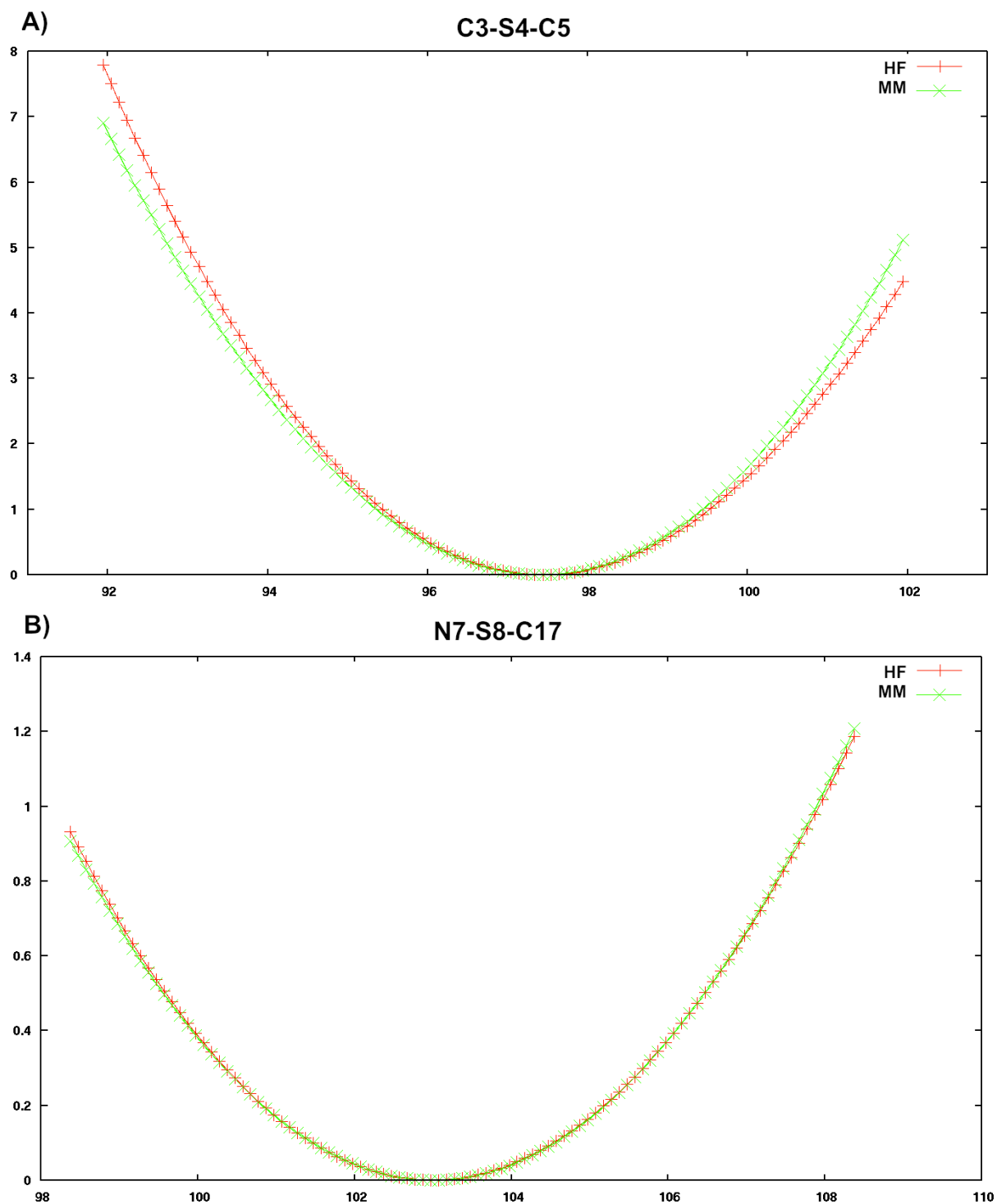
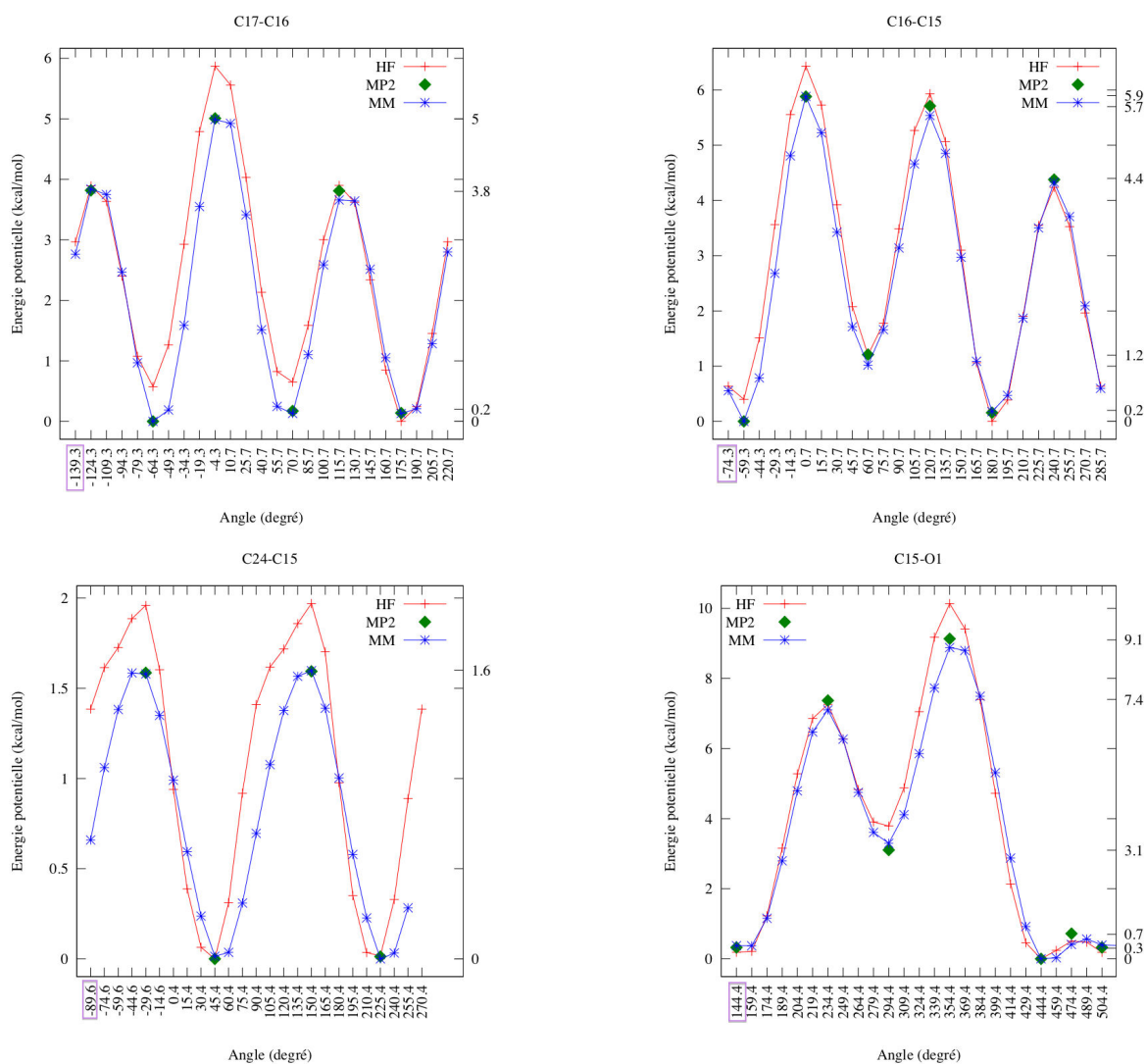


FIGURE 3.9 – Alignement des profils d'énergie potentielle HF/6-31G* et MM en fonction de la variation de l'angle de valence $C3 - \widehat{S4} - C5$ (A) ou $N7 - \widehat{S8} - C17$ (B).

FIGURE 3.10 – Profils énergétiques pour les angles dièdres des liaisons C17-C16, C16-C15, C24-C15, C15-O1, C1-C2, N7-C8, C8-C9, et C9-C10 du ligand **8**. En croix, les profils énergétiques obtenus lors des calculs avec la méthode HF/6-31G*. En étoile, les profils énergétiques obtenus pour les calculs MM après optimisation des nouveaux paramètres de CHARMM22. En losange, les valeurs d'énergie obtenues par un calcul d'énergie au niveau MP2/6-31G* sur les structures des points sels. Les valeurs d'énergie MP2/6-31G*/HF/6-31G* ont été reportées sur l'axe des ordonnées à droite (pour des raisons de lisibilité, certaines valeurs ne sont pas indiquées). Les valeurs mesurées dans la structure cristallographique sont encadrées. Pour C1-C2, la valeur choisie pour démarrer le scan correspond à la valeur mesurée sur la géométrie du ligand optimisée en HF/6-31G*.



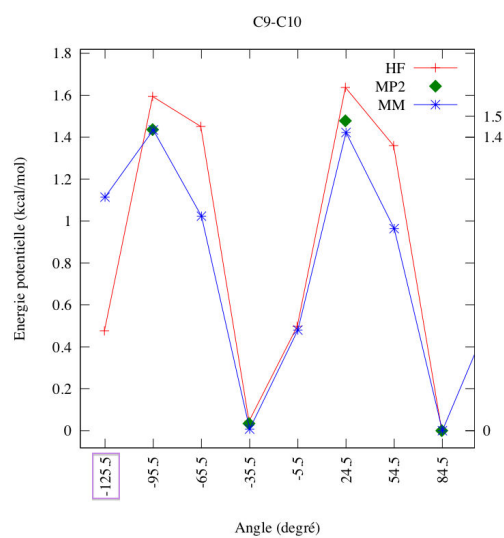
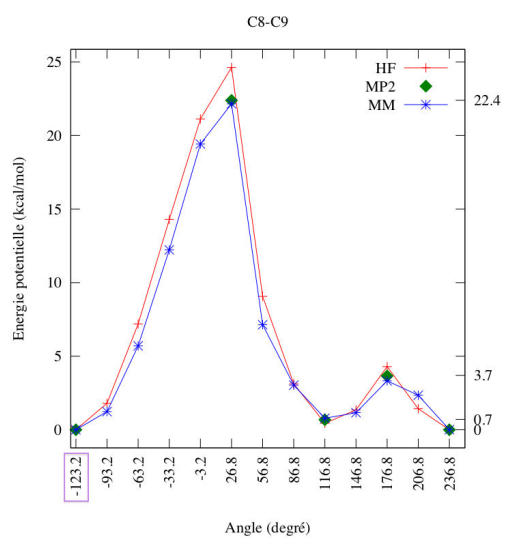
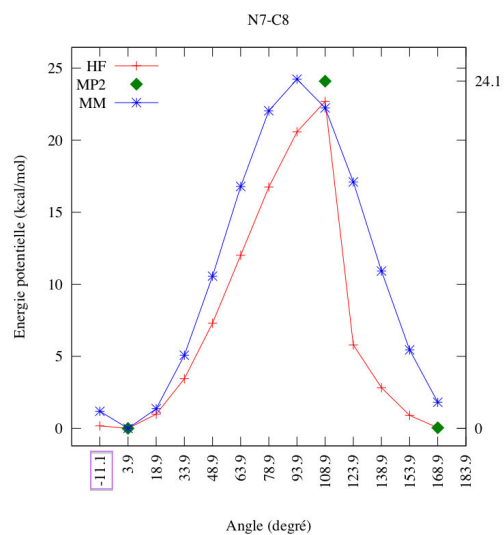
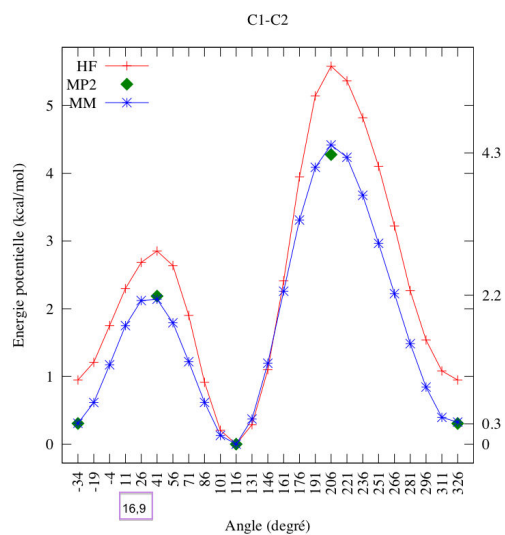
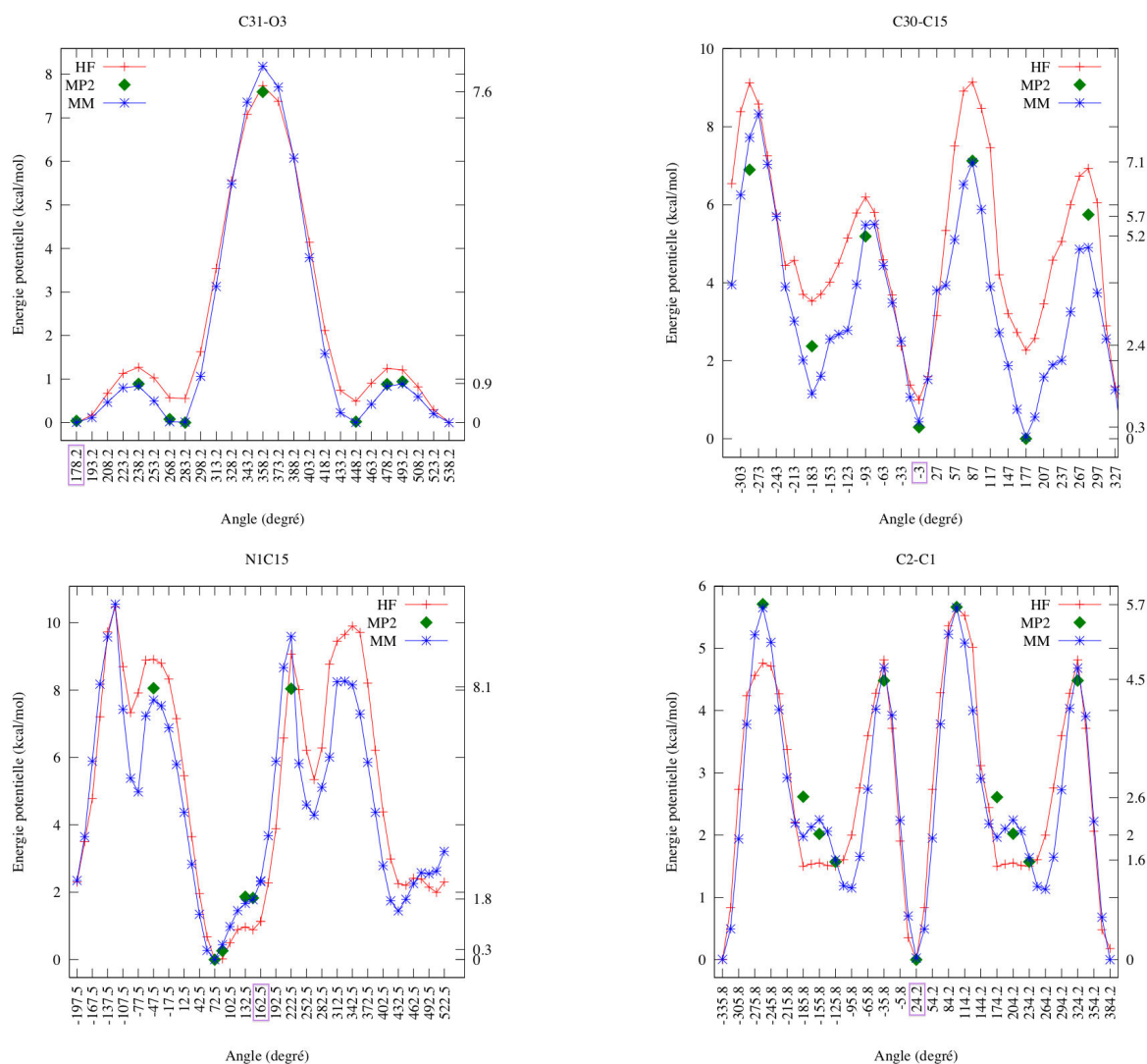
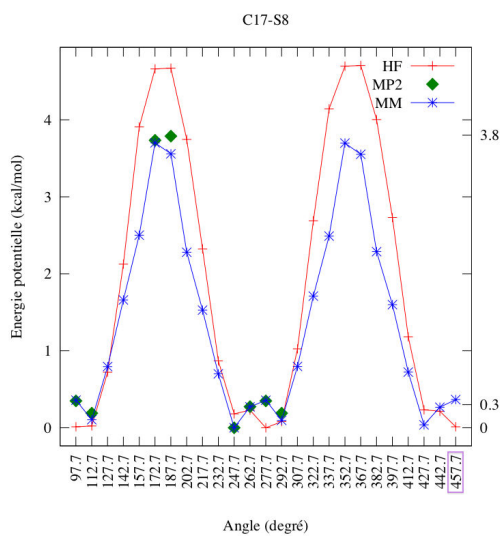
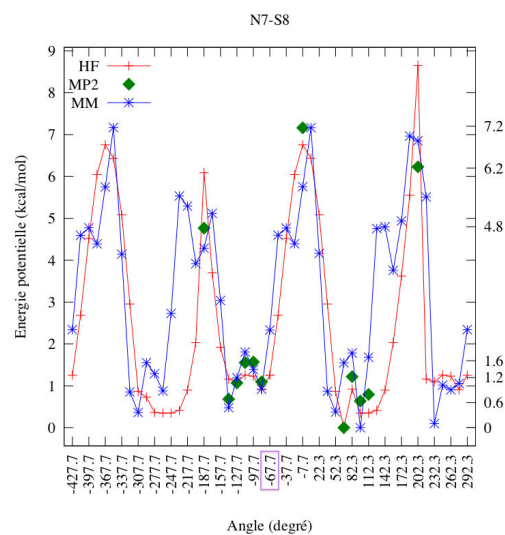
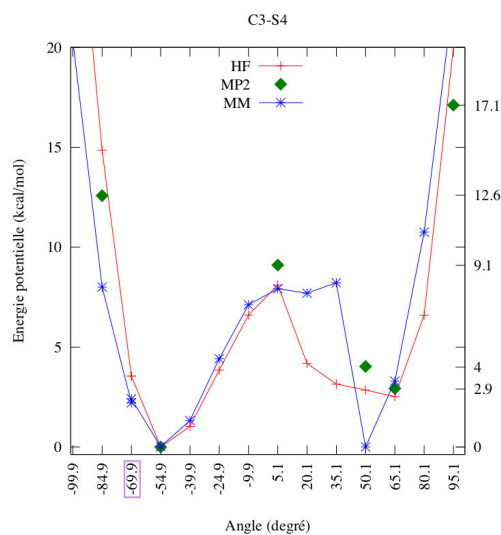


FIGURE 3.11 – Profils énergétiques pour les angles dièdres des liaisons C31-O3, C30-C15, C15-N1, C1-C2, C3-S4, N7-S8 et C17-S8 du ligand **308**. En croix, les profils énergétiques obtenus lors des calculs avec la méthode HF/6-31G*. En étoile, les profils énergétiques obtenus pour les calculs MM après optimisation des nouveaux paramètres de CHARMM22. En losange, les valeurs d'énergie obtenues par un calcul d'énergie au niveau MP2/6-31G* sur les structures des points selles. Les valeurs d'énergie MP2/6-31G*//HF/6-31G* ont été reportées sur l'axe des ordonnées à droite (pour des raisons de lisibilité, certaines valeurs ne sont pas indiquées ; de même pour l'axe des abscisses). Les valeurs mesurées dans la structure cristallographique sont encadrées.





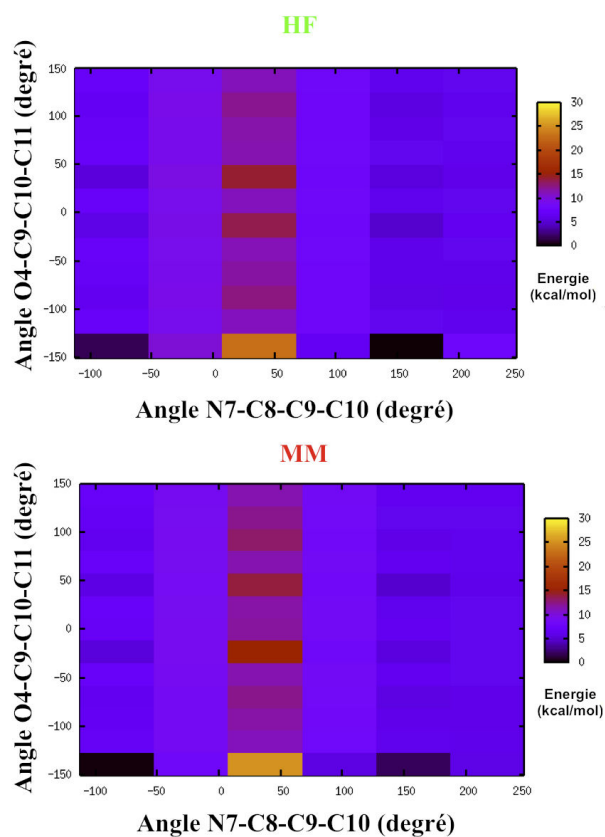


FIGURE 3.12 – Scan optimisé de la rotation autour des liaisons covalentes C8-C9 et C9-C10 du ligand **8**.

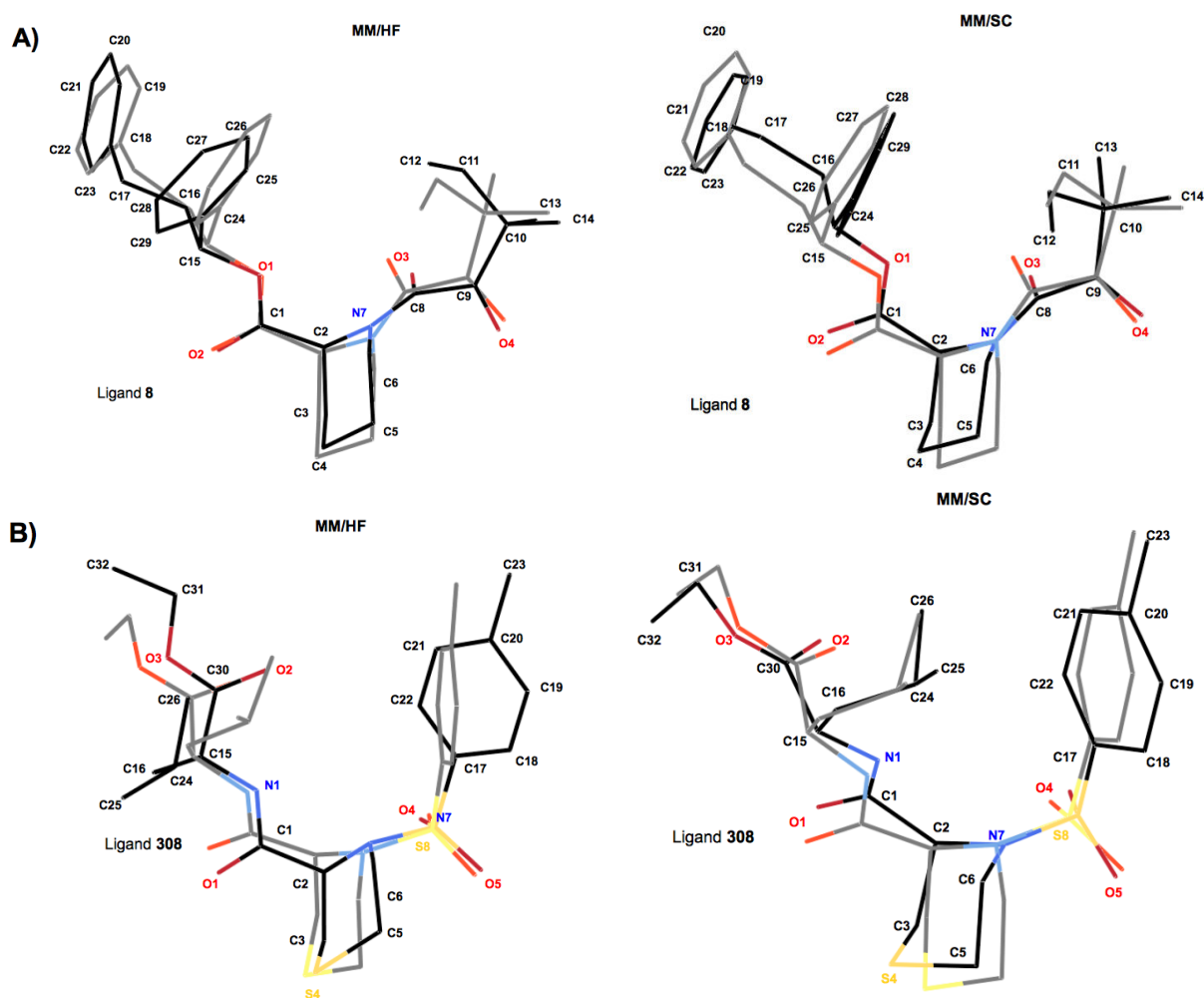


FIGURE 3.13 – Alignement de la géométrie du ligand **8** (A) et du ligand **308** (B) optimisée par MM (atomes de carbone en gris) sur la géométrie optimisée en HF/6-31G* (atomes de carbone en noir ; structure à gauche) et sur la géométrie tirée de la structure cristallographique (atomes de carbone en noir ; structure à droite).

Chapitre 4

Les états complexés FKBP12-8 et FKBP12-308

À l'issue du mécanisme de complexation moléculaire, un état stable se forme par interaction entre la protéine et son ligand. Cet état est appelé complexe moléculaire ou état complexé (EC). Il est possible d'obtenir les structures d'un état complexé par des méthodes expérimentales telles que la cristallographie par diffraction des rayons X ou la résonance magnétique nucléaire (RMN). Ces structures permettent d'obtenir des informations sur les positions relatives des atomes et sur les interactions formées entre les deux partenaires. Les structures expérimentales des complexes peuvent servir de structures initiales pour les simulations de dynamique moléculaire. Ces simulations permettent parfois d'obtenir des informations plus détaillées sur les mouvements des molécules ainsi que sur leurs interactions.

Dans la présente étude, des simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées à partir des structures cristallographiques des complexes FKBP12-8 et FKBP12-308 (codes PDB respectifs 1FKG et 1J4I). Dans cette étude, une distinction a été faite entre les structures cristallographiques des complexes FKBP12-8 et FKBP12-308 (nommées respectivement SC1 et SC2 dans la suite) qui présentent une vue figée des complexes et les ensembles de structures obtenues lors des simulations de ces complexes qui permet d'échantillonner la surface d'énergie libre correspondant aux deux états complexés. Ces ensembles de structures sont nommés respectivement EC1 et EC2 dans la suite. Dans un premier temps, des simulations des deux états complexés EC1 et EC2 ont été réalisées afin (i) de valider les paramètres optimisés pour les

deux ligands et (ii) de valider une procédure de simulation combinant la méthode de dynamique moléculaire de Langevin (LD) [33] et le modèle de solvation implicite *Effective Energy Function 1* (EEF1) [34]. Dans un deuxième temps, des simulations des deux états complexés ont été réalisées en utilisant la méthode *Stochastic Boundary molecular Dynamics* (SBD) [35] qui utilise une représentation explicite de la solvation des états complexés. En règle générale, des simulations utilisant des représentations explicites du solvant donnent des résultats plus précis et plus proches des données expérimentales que celles utilisant des représentations implicites [84]. De ce fait, une comparaison des états complexés obtenus par les types de simulation LD et SBD, ainsi qu’une comparaison des données associées à ces simulations avec les données expérimentales, a été utilisée pour valider notre procédure de simulation LD. Les simulations LD ont été dans un dernier temps utilisées dans la procédure d’expulsion du ligand afin de caractériser des états intermédiaires formés au cours de ce processus de décomplexation et qui seront présentés chapitre 5 p. 119.

Dans ce chapitre, les méthodes utilisées pour simuler les états complexés EC1 et EC2 sont d’abord détaillées. Puis, les résultats des analyses effectuées sur l’ensemble des structures correspondant à chaque état complexé sont présentés.

1. Procédure de simulation des états complexés EC1 et EC2

Les structures cristallographiques, nommées SC1 et SC2 respectivement pour FKBP12-8 et FKBP12-308 (codes PDB respectifs 1FKG et 1J4I), qui ont été utilisées pour réaliser les simulations moléculaires ont nécessité des ajustements, en raison de l’absence ou de positions erronées pour certains atomes [85]. Ces ajustements ont été effectués afin d’obtenir, après simulation, des états complexés stables dont les caractéristiques structurales sont en accord avec les données expérimentales.

Dans cette section, les préparations des structures initiales des complexes FKBP12-8 et FKBP12-308 (nommées SI1 et SI2) utilisées au départ des simulations des états respectifs EC1 et EC2 sont détaillées. Ensuite, les paramètres ainsi que la procédure pour les simulations LD

et SBD conduisant à l'obtention des états complexés sont décrits.

1.1. Préparations des structures initiales SI1 et SI2

Les structures expérimentales SC1 et SC2 ont été caractérisées à une résolution élevée (inférieure ou égale à 2 Å). Malgré cela, ces structures présentent certains défauts qui ont été corrigés. À une résolution avoisinant 2 Å, les positions des atomes ne sont pas parfaitement déterminées. Notamment, les positions déterminées pour les molécules d'eau proches du complexe sont souvent incorrectes et les atomes d'hydrogène peuvent être manquants dans la structure cristallographique. Ainsi, comme dans la plupart des études, nous avons choisi d'éliminer l'ensemble des molécules d'eau présente dans les structures cristallographiques des complexes. Afin d'ajouter les atomes d'hydrogène manquants dans les structures SC1 et SC2, l'outil *AddH* implémenté dans Chimera [86] et la méthode *hbuild* implémentée dans le programme CHARMM ont été utilisés respectivement pour obtenir SI1 et SI2. Les atomes d'hydrogène de SI1, présentés dans le tableau 4.1, ont été réorientés manuellement afin d'optimiser la formation de réseaux de liaison hydrogène fournis par une analyse de la structure SC1 par le serveur Whatif^a [87]. Pour SI2, aucun atome d'hydrogène n'a été réorienté puisque le placement automatique a permis de former les réseaux de liaison hydrogène attendus par l'analyse de SC2 par Whatif.

Pour SI1, les positions des chaînes latérales des résidus Glu31, Lys35, Phe46, Glu60, Glu61, Asp79, Tyr80 et Phe99 (voir figure A.1 p. 205 en Annexes) ont dû être modifiées afin : (i) soit de réduire les recouvrements que formaient les sphères de van der Waals de certains de leurs atomes, (ii) soit de permettre de former de nouvelles liaisons hydrogènes pour optimiser les réseaux de liaisons hydrogènes, (iii) soit d'éviter la formation d'interaction pouvant contribuer à la déformation de la structure de FKBP12 (*vide infra*). Afin de générer d'autres conformations pour les chaînes latérales, la librairie de rotamères de Dunbrack [88] a été utilisée^b. En plus de satisfaire les critères ci-dessus exposés, les conformères ont été choisis par similarité avec ceux trouvés dans d'autres structures expérimentales de FKBP12. Le tableau 4.2 présente les atomes des chaînes latérales dont les positions ont été modifiées ainsi que les raisons de ces

a. <http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>

b. Dans le programme Chimera, l'outil *Rotamers* permet de sélectionner la librairie de rotamères et le résidu pour lequel un nouveau rotamère est sélectionné.

TABLEAU 4.1 – Liste des atomes d’hydrogène de SI1 qui ont été manuellement réorientés afin : (i) d’optimiser la formation des réseaux de liaisons hydrogènes observés après analyse de la structure de SC1 par le serveur Whatif, (ii) de réduire les recouvrements entre les sphères de van der Waals des atomes, ou (iii) d’éviter de former des interactions qui peuvent contribuer à la déformation de la structure de FKBP12.

Atome d’hydrogène réorienté	Partenaire d’interaction
Thr6-H ^{γ1}	Gln70-N ^{ε2} (<i>d</i>)
Thr14-H ^{γ1}	Asp11-O ^{δ2} (<i>a</i>)
Tyr26-H ^η	Asp37-O ^{δ2} (<i>a</i>)
Tyr26-H ^η (<i>c</i>)	Arg42-N ^{η2} -H
Thr27-H ^{γ1} (<i>c</i>)	Ser38-H ^γ
Ser38-H ^γ	Thr27-O ^{γ1} (<i>b</i>)
Ser39-H ^γ (<i>c</i>)	Tyr26-N-H
	His25-N ^{δ1} -H
Ser67-H ^γ	Gln70-O ^{ε1} (<i>b</i>)
Thr75-H ^{γ1}	Glu5-O ^{ε2} (<i>a</i>)
Ser77-H ^γ	Asp79-O ^{δ1} (<i>a</i>)
Tyr80-H ^η	Glu61-O ^{ε1} (<i>a</i>)
Thr96-H ^{γ1}	Glu31-O ^{ε1} (<i>e</i>)
	Glu31-O ^{ε2} (<i>e</i>)

a. La liaison hydrogène a été créée.

b. La liaison hydrogène présente dans la structure cristallographique a été renforcée.

c. L’atome d’hydrogène du groupement hydroxyle a été réorienté afin de permettre de former une liaison hydrogène entre l’atome d’oxygène de ce groupement hydroxyle et le partenaire.

d. L’atome d’hydrogène a été éloigné de ce partenaire afin de réduire le recouvrement entre les sphères de van der Waals observé dans la structure cristallographique.

e. L’atome d’hydrogène a été éloigné de ce partenaire afin d’éviter la formation d’une liaison hydrogène qui contribue à la déformation de la structure de FKBP12 durant les simulations en solvation implicite.

modifications^c. D'après des résultats préliminaires de simulations LD de EC1 et de EC2, nous avons pu déterminer que la position de la chaîne latérale du résidu Glu31 observée dans chacune des structures cristallographiques était en partie responsable de l'apparition d'une déformation de la structure de la zone Tyr82-Ala95, appelée boucle 80 (voir figures 1.1, 4.1 (A) et (B), et sous-section 1.2. p. 79). La modification du rotamère pour cette chaîne latérale a donc été nécessaire. Pour les simulations LD de EC2, seule la position de la chaîne latérale du résidu Glu31 a été modifiée pour préparer SI2.

Dans SC2, le ligand **308** ne contient pas les atomes du groupement éthyle lié à l'atome **308-O3** de la partie Ethe (figure 3.3 p. 36). Pour obtenir SI2, les atomes de carbone et d'hydrogène manquants ont été reconstruits et positionnés en utilisant les outils de modification de structure implémentés dans Chimera. Toutefois, cette reconstruction ne garantit pas que la position obtenue correspond à celle qui serait observée expérimentalement. Afin de tester neuf positions différentes pour ce groupement éthyle, les constructions ont été effectuées en faisant varier l'angle dièdre correspondant à la rotation autour de la liaison covalente C31-O3. À partir de ces neuf positions différentes et en fixant les positions de tous les atomes sauf ceux du groupement éthyle, une minimisation de chaque structure SI2 créée a été suivie de simulations de dynamique moléculaire. Pour l'étape de minimisation, les positions du groupement C32-C31 ont été optimisées par minimisation de l'énergie en utilisant la méthode *steepest descent* (SD) avec une tolérance de gradient de $0,001 \text{ kcal/mol.}\text{\AA}^{-1}$ suivi de la méthode des gradients conjugués (CG) avec une tolérance de gradient de $0,001 \text{ kcal/mol.}\text{\AA}^{-1}$. Pour l'étape de simulation, une période de 600 ps de chauffage a permis d'amener le système à une température de 300 K suivie de 20 ps d'équilibration à cette température. Enfin, pour chacune des neuf positions pour le groupement éthyle initialement créées, deux productions indépendantes de 100 ps à 300K ont permis de générer différentes positions de ce groupement. Chacune des dernières structures issues des 18 productions a ensuite été optimisée par minimisation de l'énergie en utilisant la méthode *Adopted-Basis set Newton-Raphson* (ABNR) avec une tolérance de gradient de $0,05 \text{ kcal/mol.}\text{\AA}^{-1}$. Après l'optimisation du groupement éthyle de ces 18 structures, la structure SI2 sélectionnée était celle associée à l'énergie minimale.

c. Les réorientations manuelles de certains atomes d'hydrogène des chaînes latérales qui ont été modifiées dans SI1 ont été réalisées après la sélection de nouveaux rotamères.

TABEAU 4.2 – Nouveaux rotamères pour les chaînes latérales des résidus Glu31, Lys35, Phe46, Glu60, Glu61, Asp79, Tyr80 et Phe99 de SI1 sélectionnés à partir de la librairie de rotamères de Dunbrack afin : (i) de permettre la formation de nouvelles liaisons hydrogènes, (ii) de réduire les recouvrements entre les sphères atomiques de van der Waals dans SC1, ou (iii) d’éviter la formation de liaisons hydrogènes participant à la déformation de la boucle 80 lors des simulations LD de EC1.

Atome du nouveau rotamère	Partenaire d’interaction
Glu31-O ^{ε1}	Thr96-H ^{γ1} (<i>d</i>)
Glu31-O ^{ε2}	Thr96-H ^{γ1} (<i>d</i>) Thr96-H (<i>c</i>)
Lys35-N ^ζ -H	Asp41-O ^{δ1} (<i>a</i>) Asp41-O ^{δ2} (<i>a</i>)
Phe46-C ^{ε2}	ligand-C4 (<i>c</i>)
Phe46-C ^ζ	ligand-C5 (<i>c</i>)
Glu60-O ^{ε1}	Gly51-H (<i>a</i>) Gln53-H (<i>a</i>)
Glu60-O ^{ε2}	Gly51-H (<i>a</i>)
Glu61-O ^{ε2}	Arg57-N ^ε -H (<i>a</i>) Arg57-N ^{η2} -H (<i>a</i>)
Asp79-O ^{δ1}	Ser77-H ^γ (<i>b</i>)
Tyr80-H ^η	Glu61-O ^{ε1} (<i>a</i>)
Phe99-C ^{ε2}	8-C8 (<i>c</i>)
Phe99-C ^ζ	8-O3 (<i>c</i>)

a. La liaison hydrogène a été créée.

b. La liaison hydrogène présente dans la structure cristallographique a été renforcée.

c. Le recouvrement entre les sphères de van der Waals de ces atomes a été réduit ou supprimé.

d. Ces atomes ont été éloignés afin d’éviter ou de réduire la déformation de la boucle 80.

Pour finir, d'après les résultats de l'analyse des structures cristallographiques par Whatif, les positions des atomes $O^{\epsilon 1}$ et $N^{\epsilon 2}$ du résidu Gln70 observées dans SC1 ainsi que celles des atomes $O^{\delta 1}$ et $N^{\delta 2}$ du résidu Asn43 et des atomes $O^{\epsilon 1}$ et $N^{\epsilon 2}$ du résidu Gln53 observées dans SC2 ont été échangées. Les résidus histidine dans SI1 et SI2 sont déprotonés, excepté le résidu His25 de SI1 qui est protoné afin de permettre la formation de deux liaisons hydrogènes avec les résidus Ser39 et Asn43. Pour les résidus d'histidine déprotonés, les tautomères ϵ ont été choisis, excepté pour le résidu His25 de SI2 afin de permettre des liaisons hydrogènes, tel qu'indiqué par l'analyse de SC2 par Whatif.

1.2. Simulations des états complexés EC1 et EC2

Les simulations de dynamique moléculaire permettant d'obtenir des états complexés stables ont été effectuées en utilisant deux types de simulation : LD et SBD^d. Les détails des paramètres et de la procédure de simulation LD et SBD sont présentés dans les sous-sections respectives 1.2.1. et 1.2.2. p. 82.

1.2.1. Simulations LD

Pour les simulations LD, plusieurs tests préliminaires ont conduit à un ajustement des paramètres de simulation. Premièrement, la méthode de *shift* de l'énergie électrostatique a été utilisée pour réduire les interactions électrostatiques entre 7 Å et 9 Å. Deuxièmement, la méthode LD utilise un coefficient de friction (voir les détails sur le paramètre γ de l'équation 2.10 p. 19) qui permet de prendre en compte les effets du solvant. Plus ce paramètre est élevé, plus la mobilité des atomes est limitée^e. Afin de choisir la valeur du coefficient de friction permettant d'obtenir des résultats de simulation en accord avec les données expérimentales, les valeurs de 10 et 60 ps⁻¹^f ont été testées. Les tests préliminaires de simulation LD de EC1 ont montré une

^d. Toutes les simulations ont été effectuées en utilisant le programme CHARMM et le champ de force CHARMM22 contenant les paramètres qui ont été développés dans cette étude pour les ligands **8** et **308** (voir section 2. p. 35).

^e. L'utilisation d'une valeur nulle pour le coefficient de friction lors de l'utilisation de la méthode LD équivaut à l'utilisation d'une méthode de dynamique moléculaire classique.

^f. La valeur de 60 ps⁻¹ correspond approximativement à la fréquence de collision des molécules d'eau à température ambiante (300 K) [53].

conservation des structures des deux partenaires ainsi que de leurs contacts intermoléculaires seulement lors de l'utilisation de la valeur de 60 ps^{-1} . Toutefois, dans tous les cas, les tests préliminaires de simulation LD de EC1 et EC2 révèlent la déformation de la zone Tyr82-Ala95, appelée boucle 80 (voir sous-section 1.2. p. 79). Afin d'éviter ou de réduire la déformation de la boucle 80, en plus de la sélection d'un nouveau rotamère pour la chaîne latérale du résidu Glu31 (tableau 4.2), les chaînes latérales des résidus Glu31 et Lys34 ont été éloignées des résidus Ile90 et Thr96 lors des simulations LD en utilisant sur certaines distances des contraintes NOE définies avec le programme CHARMM (section 1.2. p. 18). Ainsi, durant les optimisations des structures par minimisation de l'énergie et au cours des simulations LD (comprenant les simulations de décomplexation - voir sous-section 5 p. 119), les valeurs des distances séparant les atomes des couples Thr96-O...Glu31-H, Glu31-O ^{ϵ^2} ...Thr96-O ^{γ^1} , Glu31-O ^{ϵ^1} ...Thr96-O ^{γ^1} , Glu31-O ^{ϵ^2} ...Thr96-N, et Ile90-O...Lys34-N ^{ζ} ont été maintenues au-dessus de leurs valeurs mesurées dans chaque structure cristallographique (pour SC1 respectivement 3,3, 8,8, 8,1, 8,1 et 6,4 Å ; pour SC2 respectivement 3,3, 8,7, 8,0, 7,9 et 10,6 Å). L'ensemble de ces contraintes est appelé par la suite ensemble CNTR1. En outre, la structure de la boucle 80 dans les états complexés peut être stabilisée en empêchant la formation d'une liaison hydrogène non-native entre les atomes Tyr82-O et Thr85-H formée à cause de l'absence de deux molécules d'eau situées dans la structure de cette boucle [89]. De ce fait, une contrainte NOE additionnelle, désignée CNTR2, a été utilisée afin de conserver la distance séparant les atomes Tyr82-O et Thr85-H entre 2,4 et 2,7 Å pour EC1 et entre 2,8 et 3,5 Å pour EC2 lors de l'optimisation des structures par minimisation de l'énergie jusqu'à la première période d'équilibration (*vide infra*).

La procédure de simulation LD des états complexés est précédée par une optimisation par minimisation de l'énergie des structures SI1 et SI2 (sous-section 1.1. p. 75). Cette optimisation se décompose en trois étapes. Au cours de la première étape, seuls les atomes d'hydrogène sont optimisés par la méthode SD en utilisant des contraintes harmoniques de $100 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ afin de fixer la position des autres atomes. Pour la deuxième étape, la structure du complexe est soumise à plusieurs optimisations utilisant la méthode CG au cours desquelles une diminution graduelle des contraintes harmoniques (de 100 à 0 kcal/mol/\AA^2 par pas de 5 kcal/mol/\AA^2) fixant les positions des atomes des chaînes latérales de la protéine et des parties périphériques du ligand Ph1, Ph2 et *i*Pe pour **8** et Ethe, *i*Bu et Tol pour **308**. Finalement, durant la troisième

TABLEAU 4.3 – Ensemble de contraintes CNTR3. Les valeurs de R_{min} et R_{max} utilisées pour ces contraintes correspondent respectivement à $d_{Xray}-0,3\text{\AA}$ et $d_{Xray}+0,3\text{\AA}$ où d_{Xray} représente la valeur de la distance mesurée sur SC2 (en Å).

Paire d'atome	d_{Xray}
49-O . . . 54-N ^(a)	5,2
49-O . . . Glu60-O ^{ε1} ^(a)	4,1
54-N . . . Glu60-O ^{ε1} ^(a)	5,1
57-N . . . 81-O ^(b)	5,7
69-O . . . 102-O ^{ε2} ^(b)	4,7
82-N . . . 95-O ^(b)	5,3
83-O . . . 92-O ^(b)	4,8

a. La distance séparant les atomes a été contrainte afin de simuler la présence de la molécule d'eau Wat3 déterminée dans l'étude de Szep *et al.* [90].

b. La distance séparant les atomes de la paire a été contrainte afin de simuler la présence d'une des molécules d'eau déterminée dans l'étude de Van Duyne *et al.* sur les complexes formés par FKBP12 avec FK506 et avec la rapamycine [89].

étape, la même procédure d'optimisation que lors de la deuxième étape est utilisée pour les atomes restants, *i.e.* le squelette de la protéine et le cœur du ligand (contraintes diminuées de 100 à 0 kcal/mol/Å² par pas de 5 kcal/mol/Å²). Pour l'optimisation des structures par minimisation de l'énergie, les ensembles de contraintes CNTR1 et CNTR2 ont été utilisés pour les deux états complexés. Pour EC2 uniquement, les contraintes présentées dans le tableau 4.3 ont été utilisées. Ces contraintes permettent de compenser l'absence des molécules d'eau explicites qui pourraient notamment être présentes au milieu des boucles 80 et 50 afin de stabiliser leur structure [89].

Pour les simulations LD des états complexés, l'ensemble des contraintes utilisées dans la procédure de simulation est résumée dans le tableau 4.5. Chaque structure optimisée par minimisation de l'énergie a d'abord été chauffée en assignant des valeurs initiales pour les vecteurs

de vitesse atomique puis les normes de ces vecteurs ont été ajustées par une méthode de *scaling* directe de sorte à obtenir, après 600 ps, des vitesses qui correspondent à un système évoluant à une température de 300 K ; différentes valeurs aléatoires ont été utilisées pour la distribution initiale des vitesses de sorte à obtenir quatre simulations indépendantes pour EC1 et six simulations indépendantes pour EC2. Les ensembles de contraintes CNTR1 et CNTR2 ont été utilisés durant la procédure de chauffage pour les deux états complexés. Pour EC2 uniquement, l'ensemble CNTR3 a de plus été utilisé. Des contraintes supplémentaires ont été utilisées afin de stabiliser les structures générales des structures lors du chauffage (ensemble de contraintes CNTR4 du tableau 4.4). La procédure de chauffage a été suivie par deux équilibres de 500 ps chacune à 300 K. Lors des simulations d'équilibration, les normes des vecteurs de vitesse atomique sont réajustées afin d'éviter que la température ne s'écarte de plus de 10 K par rapport à 300 K. Au cours de la première période d'équilibration, les mêmes ensembles de contraintes NOE que pour la procédure de chauffage sont appliqués. Pour la seconde période d'équilibration et pour la production, les ensembles de contraintes CNTR1, CNTR2 et CNTR3 ont été utilisés pour EC2 alors que seul l'ensemble CNTR1 a été utilisé pour EC1, comme résumé dans le tableau 4.5.

Les simulations LD de EC1, appelées LD1, ont permis d'obtenir 15,5 ns de simulation, soit 4, 3, 5 et 3,5 ns respectivement pour les simulations LD11, LD12, LD13 et LD14. De la même façon, les simulations LD de EC2, appelées LD2, ont permis d'obtenir 53 ns de simulation, soit 10, 10, 6, 3, 8, 6 et 10 ns respectivement pour les simulations LD21, LD22, LD23, LD24, LD25, LD26 et LD27 (voir tableau 4.6 p. 85).

1.2.2. Simulations SBD

Afin de réaliser les simulations SBD des états complexés, après avoir effectué les préparations présentées dans la section 1.1. p. 75, le centre de chaque complexe a été positionné au centre d'une sphère de 25 Å contenant des molécules d'eau de type TIP3P [72, 91]. La taille de cette sphère est suffisante pour obtenir au minimum une couche d'eau tout autour du complexe. Les molécules d'eau superposées aux atomes du ligand ou de la protéine ont été supprimées sur la base des recouvrements entre leur sphère de van der Waals. La fonction de *switch* entre 11 et 14 Å a été utilisée afin de diminuer la force et l'énergie respectivement pour les interactions

TABLEAU 4.4 – Ensemble de contraintes CNTR4. Les valeurs de R_{min} et R_{max} utilisées pour ces contraintes correspondent respectivement à $d_{Xray} - 0,4\text{\AA}$ et $d_{Xray} + 0,4\text{\AA}$ où d_{Xray} correspond soit à d_{Xray1} soit à d_{Xray2} . d_{Xray1} et d_{Xray2} représentent les valeurs de distance qui ont été mesurées respectivement dans SC1 et SC2 (en \AA).

Paire d'atomes	d_{Xray1}	d_{Xray2}	Paire d'atomes	d_{Xray1}	d_{Xray2}
Glu5-O ϵ^2 ... Thr75-H γ^1 ^(a)	1,9	7,5	Ser77-O... Tyr80-H ^(b)	1,8	2,2
Asp11-O δ^1 ... Arg13-H ^(a)	1,9	2,1	Pro78-O... Ala81-H ^(b)	2,1	
Asp11-O δ^1 ... Thr14-H ^(a)	1,8	1,8	Pro78-O... Gly83-H ^(b)	2,0	1,8
Tyr26-O η ... Arg42-H η^{22} ^(a)	2,0	2,0	Asp79-O δ^1 ... Ser77-H γ ^(a)	1,8	1,8
Thr27-O γ^1 ... Ser38-H γ ^(a)	1,9	3,0	Tyr82-O... Gly86-H ^(b)	1,9	1,9
Asp32-O δ^1 ... Lys34-H ^(a)	2,0	2,1	Gly83-O... His94-H ^(b)	1,7	1,7
Asp37-O δ^1 ... Arg42-N η^1 ^(a)	3,1	3,2	His87-O... Ile90-H ^(b)	2,0	2,3
Asp37-O δ^2 ... Tyr26-H η ^(a)	1,8	1,8	His87-O... Ile91-H ^(b)	1,9	1,8
Asp37-O δ^2 ... Arg42-N η^1 ^(a)	2,9	3,1	Ile91-O... His87-H ^(b)	2,0	1,7
Asp41-O δ^2 ... Lys35-N ζ ^(a)	2,8	2,8	8 -O2... Ile56-H ^(c)	1,9	
Glu54-O ϵ^1 ... Lys52-N ζ ^(a)	2,9	4,1	8 -O3... Tyr82-O η -H ^(c)	1,7	
Glu61-O ϵ^2 ... Arg57-H ϵ ^(a)	2,2	2,3	308 -O1... Ile56-H ^(d)		1,9
Glu61-O ϵ^2 ... Arg57-H η^{21} ^(a)	2,2	2,8	308 -H1... Tyr82-O η ^(d)		2,6
Glu61-O ϵ^1 ... Tyr80-H η ^(a)	1,9	4,3	308 -O2... Tyr82-O η -H ^(d)		1,7

a. La distance séparant les atomes a été contrainte afin de stabiliser la structure de la protéine en réduisant les fluctuations importantes des résidus impliqués.

b. La distance séparant les atomes a été contrainte afin d'éviter ou de réduire la déformation de la structure de la boucle 80.

c. La distance séparant les atomes a été contrainte afin de maintenir la position relative du ligand **8** proche de celle observée dans SC1.

d. La distance séparant les atomes a été contrainte afin de maintenir la position relative du ligand **308** proche de celle observée dans SC2.

TABLEAU 4.5 – Récapitulatif des ensembles de contraintes utilisés au cours des différentes étapes de simulation des états EC1 et EC2.

	EC1		EC2	
Étape	LD1	SBD1	LD2	SBD2
Chauffage	CNTR1, CNTR2, CNTR4	CNTR1, CNTR2, CNTR4, CNTR5	CNTR1, CNTR2, CNTR3, CNTR4	CNTR1, CNTR2, CNTR4, CNTR5
Équilibration 1	CNTR1, CNTR2, CNTR4	CNTR1, CNTR2, CNTR4, CNTR5	CNTR1, CNTR2, CNTR3, CNTR4	CNTR1, CNTR2, CNTR4, CNTR5
Équilibration 2	CNTR1	∅	CNTR1, CNTR2 CNTR3	∅
Production	CNTR1	∅	CNTR1, CNTR2 CNTR3	∅

électrostatiques et de van der Waals.

Les formes hydratées des structures SI1 et SI2 de la section 1.1. p. 75 ont été optimisées par minimisation de l'énergie en quatre étapes. Lors de la première étape, seules les structures des molécules d'eau ont été optimisées par minimisation de l'énergie en utilisant la méthode SD (avec une tolérance de gradient de 1 kcal/mol/Å) tandis que les positions des atomes de la protéine et du ligand ont été fixées. Au cours de la deuxième étape, les positions des atomes du ligand et du solvant ont été contraintes tandis que la structure de la protéine a été optimisée en utilisant la méthode SD (avec une tolérance de gradient de 0,5 kcal/mol/Å). Durant la troisième étape, seules les contraintes sur les positions des atomes du solvant sont maintenues tandis que les structures du ligand et de la protéine sont optimisées en utilisant la méthode SD (avec une tolérance de gradient de 0,1 kcal/mol/Å). Lors de la dernière étape d'optimisation, tous les atomes du système sont soumis à une minimisation de l'énergie en utilisant la méthode SD (avec une tolérance de gradient de 1 kcal/mol/Å). Le système est ensuite chauffé en assignant les vitesses atomiques jusqu'à obtenir, après 30 ps, des vitesses qui correspondent à un système évoluant à une température de 300 K ; différentes assignations des vitesses initiales ont été utilisées afin d'effectuer trois simulations indépendantes pour EC1 et six pour EC2. Du-

TABLEAU 4.6 – Récapitulatif des temps de production pour les simulations LD et SBD des états EC1 et EC2.

		EC1 X=1	EC2 X=2
LDX	LDX1	4 ns	10 ns
	LDX2	3 ns	10 ns
	LDX3	5 ns	6 ns
	LDX4	3,5 ns	3 ns
	LDX5	∅	8 ns
	LDX6	∅	6 ns
	LDX7	∅	10 ns
	Total	15,5 ns	53 ns
SBDX	SBDX1	5 ns	4 ns
	SBDX2	5 ns	7 ns
	SBDX3	5 ns	5 ns
	SBDX4	∅	4 ns
	SBDX5	∅	4,48 ns
	SBDX5	∅	3 ns
	Total	15 ns	27,5 ns

rant la procédure de chauffage, les ensembles de contraintes CNTR1, CNTR2 et CNTR4 ont été appliqués pour les deux états complexés. D'autres contraintes NOE ont été appliquées sur tous les couples d'atomes entre le ligand et la protéine pour lesquels la distance de séparation est inférieure ou égale à 5 Å dans les structures cristallographiques respectives (ensemble de contraintes CNTR5). L'ensemble de contraintes CNTR5 a été appliqué afin de maintenir les valeurs des distances à moins de 0,4 Å de leurs valeurs mesurées dans les structures cristallographiques.

La procédure de chauffage a été suivie par deux périodes d'équilibration de durée respective 300 et 150 ps. Au cours des périodes d'équilibration, les vitesses atomiques sont réajustées afin d'éviter que la température ne s'écarte de plus de 10 K par rapport à 300 K pour EC1 et EC2. Les ensembles de contraintes CNTR1, CNTR2, CNTR4 et CNTR5 ont été appliqués durant la première période d'équilibration mais supprimés pour les simulations de la deuxième période d'équilibration et pour la production (voir tableau 4.5). Les simulations SBD de EC1, appelées SBD1, ont permis d'obtenir 15 nanosecondes de simulation de cet état : 5 ns pour chaque production indépendante SBD11, SBD12 et SBD13. Les simulations SBD de EC2, appelées SBD2, ont permis d'obtenir environ 27,5 ns de simulation de cet état : 4, 7, 5, 4, 4,48 et 3 ns respectivement pour les simulations SBD21, SBD22, SBD23, SBD24, SBD25 et SBD26 (voir tableau 4.6).

2. Analyse des états complexés

Dans cette section, les résultats des simulations LD et SBD des deux états complexés sont analysés. Afin de valider les types de simulation LD et SBD, les résultats obtenus pour chaque type sont comparés aux données expérimentales. Les analyses comparatives concernent en particulier les structures de la protéine et du ligand et les interactions formées entre ces deux molécules^g. Pour chaque état complexé, en utilisant l'hypothèse d'ergodicité, ces analyses comparatives sont basées sur des moyennes d'ensemble calculées à partir de l'ensemble des moyennes temporelles issues des simulations. Sauf indication contraire, toutes les valeurs discutées sont

g. Les principaux résultats présentés pour les simulations LD et SBD de EC1 ont été publiés dans la revue *Journal of Chemical Theory and Computation* [38].

les moyennes d'ensemble.

2.1. Analyse des structures de FKBP12 et du ligand dans EC1 et EC2

Pour les simulations LD et SBD, les structures des deux partenaires ont été analysées en terme de : (i) déviations moyennes des positions atomiques par rapport à leurs positions dans la structure cristallographique (RMSD), (ii) de fréquences de contact des liaisons hydrogènes entre atomes du squelette de la protéine et (iii) de fluctuations des positions atomiques autour des positions moyennes (RMSFs).

2.1.1. RMSD

Dans un premier temps, les RMSD des atomes C α de FKBP12 et des atomes lourds du ligand ont été calculés après alignement des atomes C α de chaque structure sur leur position dans la structure cristallographique respective (appelées positions de référence). Le tableau 4.7 présente les résultats des RMSD (i) pour l'ensemble des atomes C α de la protéine, (ii) pour les atomes C α des résidus du site de fixation du ligand, (iii) pour les atomes C α des résidus ne participant pas au site de fixation du ligand, (iv) pour les atomes C α de chaque structure secondaire et de chaque boucle, (v) pour l'ensemble des atomes lourds du ligand et (vi) pour ceux de chaque partie du ligand.

Dans cette étude, le site de fixation des ligands **8** et **308** à FKBP12 a été défini par les résidus dont au moins un des atomes lourds est distant d'un atome lourd du ligand d'au plus 4 Å dans la structure cristallographique. Ainsi, le site de fixation du ligand **8** dans SC1 est formé par les résidus Tyr26, Phe36, Asp37, Phe46, Val55, Ile56, Trp59, Tyr82 et Phe99 (figure 4.1 (a)). Dans SC2, le site de fixation du ligand **308** est formé par les mêmes résidus détaillés pour le site de fixation de SC1 avec en plus les résidus Gln53, Glu54, His87, Ile90 et Ile91 (figure 4.1 (b)). Les deux sites de fixation sont formés par une cavité principale dont le fond est formé par la chaîne latérale du résidu Trp59, et une cavité latérale formée par les chaînes latérales volumineuses de la région Tyr82-Ala95, région appelée boucle 80. De plus, cette boucle 80 participe au site de fixation en s'enroulant autour de la cavité principale. Les positions des deux ligands dans leur

TABLEAU 4.7 – Valeurs moyennes et écarts types des RMSD (Å) pour les différents groupes d’atomes de la protéine et du ligand après alignement des atomes C^α sur leur position de référence. Les régions de la protéine formant les structures secondaires régulières (β 1- β 6, α 1, h1 et h2) ainsi que les boucles sont discutées dans la sous-section 2.1.2. p. 92 et illustrées sur la figure 4.1. Les valeurs indiquées par des étoiles sont considérées comme élevées et sont discutées dans le texte.

	EC1			EC2		
C^α	LD1	SBD1	Différence LD1-SBD1	LD2	SBD2	Différence LD2-SBD2
Protéine entière	$0,87 \pm 0,08$	$1,02 \pm 0,08$	0,16	$0,98 \pm 0,04$	$1,80^* \pm 0,10$	0,82*
Tous les résidus sauf ceux du site de fixation	$0,89 \pm 0,08$	$1,07 \pm 0,09$	0,19	$1,01 \pm 0,04$	$1,88^* \pm 0,10$	0,88*
Résidus formant le site de fixation	$0,68 \pm 0,09$	$0,65 \pm 0,03$	0,04	$0,78 \pm 0,03$	$1,24 \pm 0,23$	0,46
β 1	$0,57 \pm 0,06$	$0,61 \pm 0,05$	0,04	$0,68 \pm 0,05$	$1,30 \pm 0,37$	0,62*
Boucle 10	$0,95 \pm 0,16$	$1,14 \pm 0,59$	0,19	$1,22 \pm 0,26$	$2,60^* \pm 0,67$	1,37*
β 4	$0,49 \pm 0,02$	$0,47 \pm 0,04$	0,02	$0,57 \pm 0,01$	$0,91 \pm 0,13$	0,34
Boucle 30	$0,49 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,03$	0,05	$0,48 \pm 0,01$	$3,65^* \pm 0,92$	3,17*
β 5	$0,50 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,03$	0,08	$0,49 \pm 0,02$	$1,97^* \pm 0,51$	1,47*
Boucle 40	$1,21 \pm 0,26$	$1,36 \pm 0,01$	0,15	$1,38 \pm 0,13$	$2,52^* \pm 0,38$	1,14*
h1	$0,72 \pm 0,07$	$0,75 \pm 0,06$	0,03	$0,84 \pm 0,13$	$3,16^* \pm 0,61$	2,32*
β 6	$1,33 \pm 0,33$	$1,85^* \pm 0,12$	0,52*	$1,47 \pm 0,26$	$0,92 \pm 0,11$	0,56*
Boucle 50	$0,69 \pm 0,07$	$0,58 \pm 0,1$	0,11	$0,64 \pm 0,03$	$1,59^* \pm 0,37$	0,95*
α	$0,86 \pm 0,05$	$0,82 \pm 0,04$	0,04	$0,92 \pm 0,05$	$0,61 \pm 0,05$	0,31
Boucle 60	$0,50 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,01$	0,04	$0,52 \pm 0,02$	$1,18 \pm 0,37$	0,66*
β 2	$0,91 \pm 0,09$	$0,56 \pm 0,05$	0,35	$0,93 \pm 0,13$	$0,81 \pm 0,16$	0,11
h2	$0,58 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,02$	0,07	$0,59 \pm 0,06$	$1,24 \pm 0,11$	0,65*
Boucle 80	$1,38 \pm 0,32$	$1,57^* \pm 0,01$	0,19	$1,56^* \pm 0,16$	$2,00^* \pm 0,16$	0,44
β 3	$1,00 \pm 0,24$	$1,49 \pm 0,45$	0,49	$1,61^* \pm 0,31$	$0,70 \pm 0,08$	0,90*

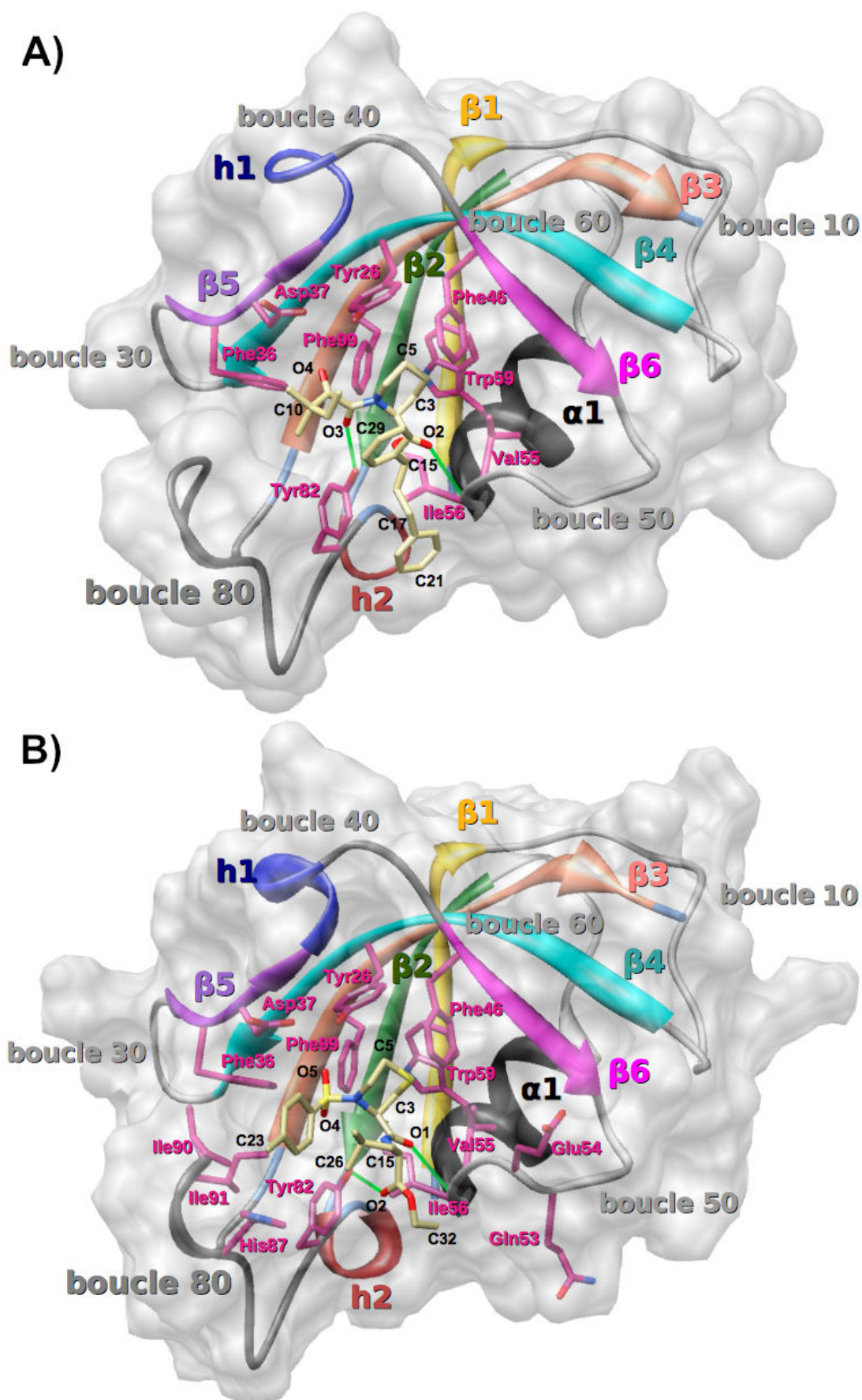
Atomes lourds	EC1			EC2		
	LD1	SBD1	Différence LD1-SBD1	LD2	SBD2	Différence LD2-SBD2
Ligand 8 ou 308	1,90* \pm 0,16	1,87* \pm 0,17	0,03	1,59* \pm 0,12	1,76* \pm 0,13	0,16
cœur	1,08 \pm 0,06	0,85 \pm 0,05	0,22	1,01 \pm 0,04	0,87 \pm 0,10	0,15
Ph1 ou Ethe	2,78* \pm 0,27	2,88 \pm 0,35	0,10	1,77* \pm 0,30	1,88* \pm 0,33	0,11
Ph2 ou <i>i</i> Bu	1,93* \pm 0,22	1,79* \pm 0,29	0,14	2,24* \pm 0,39	2,43* \pm 0,38	0,19
<i>i</i> Pe ou Tol	2,15* \pm 0,79*	2,20* \pm 0,88*	0,05	1,53* \pm 0,46	1,94* \pm 0,24	0,40

site de fixation sont présentées sur la figure 4.1.

Pour la protéine dans son ensemble, les RMSD pour l'ensemble des atomes C $^{\alpha}$ sont inférieures ou égales à 1,5 Å, ce qui correspond à des valeurs proches de celles typiquement obtenues lors de simulation de dynamique moléculaire de protéine dont la structure initiale est tirée d'une structure cristallographique [92]. La seule exception correspond à la valeur de 1,8 Å obtenue pour les simulations SBD2. En découpant la protéine en deux régions, la première correspondant aux résidus formant le site de fixation (voir figure 4.1), la seconde aux autres résidus, il apparaît que les RMSD des atomes C $^{\alpha}$ des résidus formant le site de fixation du ligand sont inférieures à ceux des autres résidus pour l'ensemble des simulations de EC1 et EC2 (de 0,4 et 0,6 Å pour, respectivement, les simulations SBD1 et SBD2).

Pour les simulations SBD2, les valeurs de RMSD qui sont les plus élevées sont observées pour l'ensemble des atomes C $^{\alpha}$ des résidus appartenant aux boucles 10, 30, 40 (entre 2,5 et 3,7 Å). Pour les simulations SBD1 et LD2, les RMSD les plus élevés sont associés à la boucle 80 et à β 3 pour LD2 et à la boucle 80 et à β 6 pour SBD1.

Pour le cœur de chaque ligand, le tableau 4.7 indique un bon accord avec la structure cristallographique (valeurs aux alentours de 1 Å). En revanche, les parties périphériques des ligands présentent des valeurs plus élevées allant de 1,5 à 2,9 Å. Ces valeurs de RMSD élevées pour les parties périphériques expliquent les valeurs élevées des RMSD pour l'ensemble des atomes lourds du ligand (entre 1,6 et 1,9 Å).



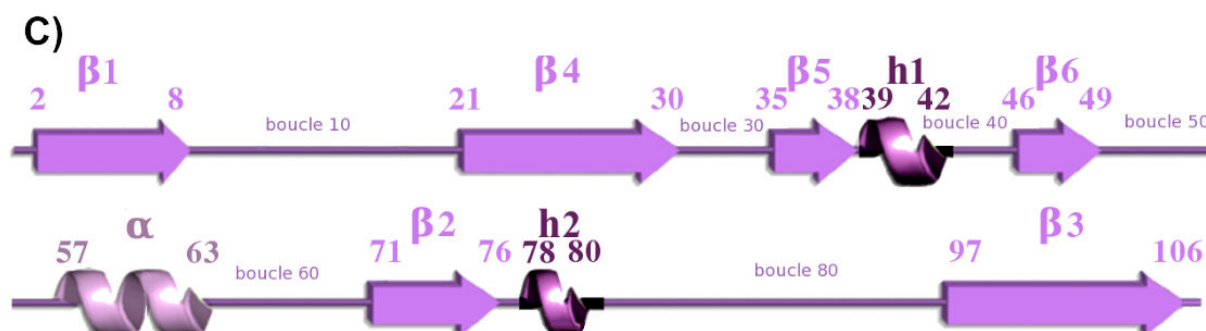


FIGURE 4.1 – Structures cristallographiques des complexes (a) FKBP12-**8** (SC1) et (b) FKBP12-**308** (SC2). Les structures secondaires de la protéine sont représentées en ruban (détails dans la sous-section 2.1.2. p. 92). Les brins β (brin $\beta 1$ à brin $\beta 6$), les hélices α (hélice α), 3_{10} (hélice h2), ainsi que les zones de structures irrégulières nommées h1 et boucle 80 sont de différentes couleurs. La surface de la protéine est également représentée en transparence. Les résidus dont un des atomes lourds forme dans la structure expérimentale un ou plusieurs contacts (distance interatomique maximale de 4 Å) avec le ligand sont également représentés. Ces résidus forment le site de fixation du ligand à FKBP12. Les liaisons hydrogènes Ile56-H \cdots O2 et Tyr82-H \cdots O3 formées entre FKBP12 et le ligand **8** dans SC1, et Ile56-H \cdots O1 et Tyr82-H \cdots O2 formées entre FKBP12 et le ligand **308** dans SC2 sont indiquées par de minces lignes vertes. (c) Assignation identique des structures secondaires de la structure de FKBP12 issues des deux complexes SC1 et SC2 obtenues par l'utilisation du programme DSSP (sous-section 2.1.2. p. 92).

Pour EC1, les valeurs de RMSD des simulations LD1 et SBD1 calculées pour les différents groupes d'atomes de la protéine et du ligand sont similaires sauf pour les brins $\beta 2$, $\beta 3$ et $\beta 6$. Pour EC2, les différences entre LD2 et SBD2 sont plus importantes mais uniquement pour les mesures qui concernent la protéine (et non pour celles concernant le ligand), avec des valeurs toutefois inférieures à 2 Å sauf pour les boucles 10, 30 et 40 ainsi que pour l'hélice h1. Afin d'étudier plus en détail les structures secondaires et les boucles de la protéine, les liaisons hydrogènes formées entre les atomes du squelette de FKBP12 ont été analysées.

2.1.2. Analyse des structures secondaires de FKBP12

Afin d'obtenir une description des structures secondaires de FKBP12, deux assignations ont été effectuées en utilisant le programme DSSP [93], l'une sur SC1 et l'autre sur SC2. Les deux assignations sont identiques pour FKBP12 dans les deux structures cristallographiques (lignes DSSP EC1/EC2 sur la figure 4.2). D'après ces assignations, FKBP12 est composée de six brins β (brins $\beta 1$ à $\beta 6$ sur la figure 4.1) formant un feuillet anti-parallèle. Les brins $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ et $\beta 6$ sont respectivement constitués des régions Val2-Ser8, Arg71-Ile76, Leu97-Leu106, Thr21-Leu30, Lys35-Ser38 et Phe46-Met49. Le feuillet β s'enroule autour d'une hélice α formée par les sept résidus de la région Arg57-Val63. Deux hélices courtes (h1 et h2), formées par les régions Ser39-Arg42 et Pro78-Tyr80, sont également retrouvées dans la structure de FKBP12 du côté N-terminal de deux régions de la protéine connues pour être très mobiles, les boucles 40 et 80 [28, 94, 95, 89, 96, 28, 97]. Au total, six boucles sont présentes afin de relier les brins $\beta 1$ et $\beta 4$ (boucle 10 formée par la région Pro9-Gln20), les brins $\beta 4$ et $\beta 5$ (boucle 30 formée par la région Glu31-Lys34), les brins $\beta 5$ et $\beta 6$ (boucle 40 formée par la région Ser39-Pro45 ; h1 est ici compris dans la définition de la boucle 40), le brin $\beta 6$ et l'hélice α (boucle 50 formée par la région Leu50-Ile56), l'hélice α et le brin $\beta 2$ (boucle 60 formée par la région Ala64-Gln70), et l'hélice h2 et le brin $\beta 3$ (boucle 80 formée par la région Tyr82-Ala95). Les assignations des structures secondaires de FKBP12 obtenues par le programme DSSP sont en accord avec la description de ces structures donnée par Van Duyne *et al.* dans leur étude sur les complexes FKBP12-FK506 et FKBP12-Rapamycine [89]. La description de Van Duyne *et al.* a été partiellement reprise par Holt *et al.* dans leur étude sur le complexe FKBP12-8 [17], sauf pour les régions Ser39-Arg42 et Pro78-Tyr80 (respectivement h1 et h2). La région Ser39-

Arg42, définie comme une hélice irrégulière par Van Duyne *et al.* et prédite comme une hélice courte par DSSP, est considérée dans l'étude de Holt *et al.* comme faisant partie de la boucle 40. Dans la même étude, la région Pro78-Tyr80, définie par Van Duyne *et al.* et prédite par DSSP comme une hélice 3_{10} , est considérée comme faisant partie de la boucle 80 par Holt *et al.*

La conservation des structures secondaires a été évaluée en suivant l'évolution des liaisons hydrogènes formées entre des atomes du squelette de la protéine. Pour les structures issues d'une simulation, la formation d'une liaison hydrogène a été vérifiée en utilisant les deux critères de contact suivants : (i) la valeur de la distance de séparation entre l'atome d'hydrogène lié à l'atome d'azote et l'atome d'oxygène ne doit pas dépasser 2,4 Å, et (ii) la valeur de l'angle $O \cdots \widehat{H} - N$ doit être comprise entre 120 et 240°. Pour chaque type de simulation d'un état complexé, des moyennes d'ensemble pour chaque fréquence de contact sont calculées pour chaque liaison hydrogène à partir de ces mêmes valeurs obtenues par simulation^h. Par exemple, pour obtenir la fréquence de contact pour la liaison hydrogène Gln3-H \cdots Thr75-O au cours des simulations LD1, la moyenne d'ensemble est calculée à partir des fréquences de contact de cette liaison hydrogène obtenues pour les simulations LD11, LD12, LD13 et LD14. Afin de pouvoir comparer les fréquences de contact des liaisons hydrogènes avec des données expérimentales, les liaisons hydrogènes formées dans les structures cristallographiques respectives entre les atomes du squelette de FKBP12 ont été recherchées en utilisant les critères de contact définis ci-dessus. Un total de 59 liaisons hydrogènes a été extrait de SC1 tandis que le total s'élève à 60 pour celles extraites de SC2, la différence provenant d'une liaison hydrogène, Ser38-O \cdots Asp41-H, observée seulement dans SC2 (distance de contact de 2,33 et 2,71 Å respectivement pour SC2 et SC1). La liste des liaisons hydrogènes extraites des structures cristallographiques servira dans la suite de référence dans la comparaison avec les simulations. Ces liaisons sont regroupées sous le nom d'ensemble de liaisons hydrogènes LHSC et sont présentées dans le tableau A.8 page 206 en Annexes.

Les liaisons hydrogènes issues des simulations ont donc été comparées à celles de l'ensemble LHSC. Afin de simplifier les comparaisons, les fréquences de contact pour les deux

^h. Pour une simulation, la fréquence de contact d'une liaison hydrogène est donnée comme le rapport entre le nombre de structures où les deux critères de contact cités sont satisfaits pour cette liaison hydrogène et le nombre total de structures de cette simulation.

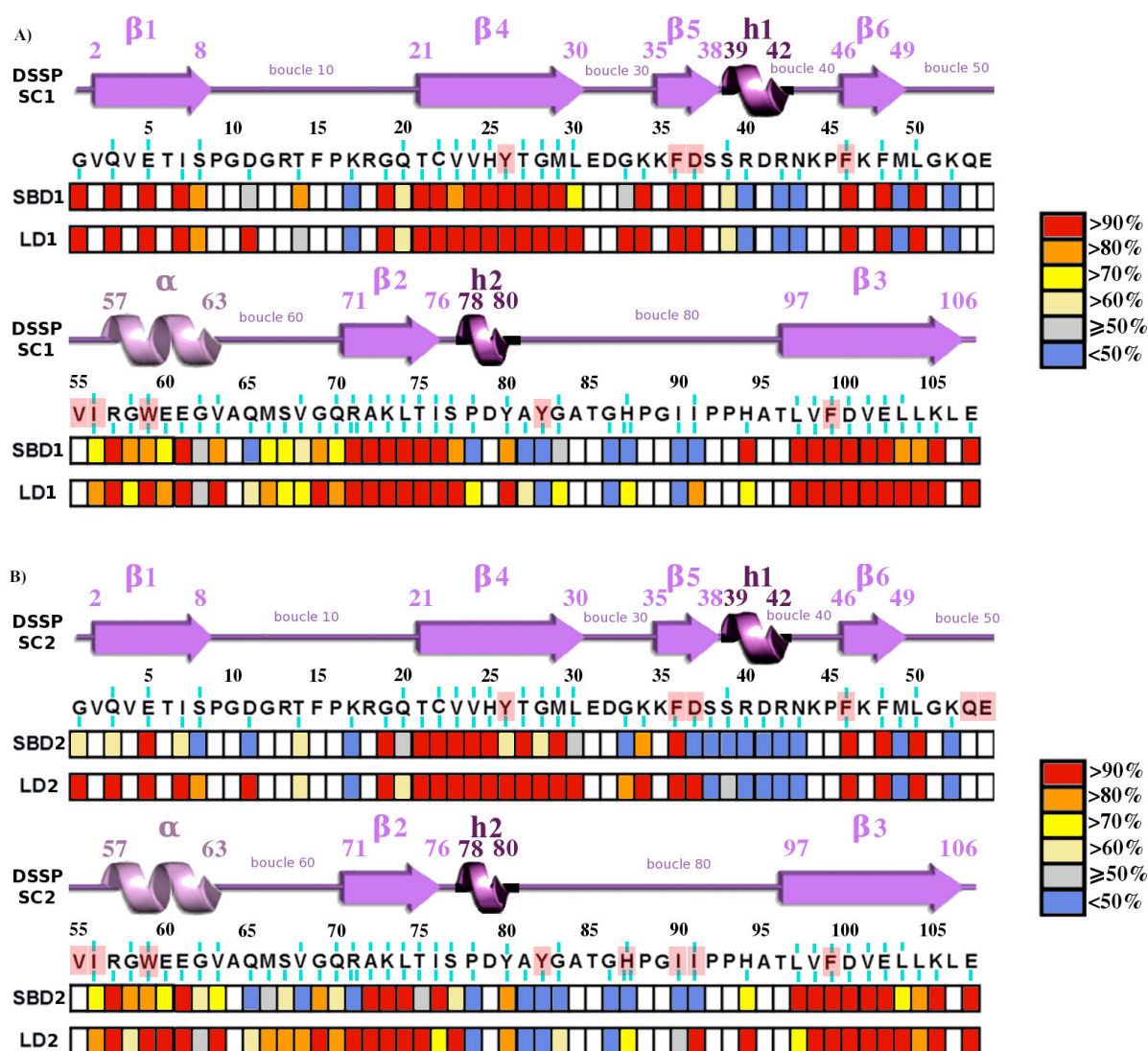


FIGURE 4.2 – Analyse des fréquences moyennes de contact des liaisons hydrogènes de l'ensemble LHSC pour les simulations LD et SBD de EC1 (A) et de EC2 (B). Toutes les valeurs sont des moyennes d'ensemble calculées pour les simulations d'un même type et par résidu. L'assignation des structures secondaires effectuée par DSSP sur EC1 et EC2 est indiquée afin d'évaluer la conservation des structures secondaires à partir de l'évolution des liaisons hydrogènes. Les acides aminés de la séquence de FKBP12 sont représentés en utilisant le code à une lettre. Le code à une lettre d'un acide aminé formant des contacts avec le ligand (voir texte) est surligné en rose. Chaque trait vertical bleu présent en dessous et/ou au-dessus d'un résidu d'acide aminé est associé à une liaison hydrogène dans l'ensemble LHSC formée et qui peut être formée par le groupement C=O et/ou par le groupement N-H de ce résidu.

ou trois liaisons hydrogènes impliquant les atomes du squelette d'un même résidu ont été regroupées en une valeur moyenne par résidu (figure 4.2). Par exemple, le résidu Gln3 forme deux liaisons hydrogènes qui appartiennent à l'ensemble LHSC : Gln3-H...Thr75-O et Gln3-O...Thr75-H (tableau A.8 p. 206 en Annexes). Les fréquences de contact de ces liaisons hydrogènes dans les structures issues des simulations LD1 sont respectivement de 98,2 et 99,0 %. Ainsi, pour le résidu Gln3, la fréquence reportée sur la figure 4.2 pour les simulations LD1 est la valeur moyenne de 98,6 % (rectangle rouge).

De manière générale, l'analyse de la figure 4.2 combinée avec celle du tableau présenté page 206 en Annexes, permet de faire ressortir que (i) les types de simulation LD et SBD donnent des résultats similaires pour les deux états complexés et (ii) les simulations LD1 et SBD1 donnent des résultats similaires à ceux obtenus pour les simulations LD2 et SBD2, notamment pour les résidus des brins β et de l'hélice α , sauf cependant pour les résultats SBD2 du brin β 1.

Les fréquences de contact des liaisons hydrogènes de l'ensemble LHSC pour les résidus des structures secondaires régulières (brins β et hélice α) sont supérieures à 70 %, sauf pour les résidus Met49 et Gly62 (dans les simulations LD1, SBD1, LD2 et SBD2), le résidu Gly58 (dans LD2) et les résidus Gln3, Ile7, Ser8, Tyr26, Asp37 (dans SBD2). Seules les liaisons hydrogènes Ser8-H...Arg71-O, Ser8-O...Arg71-H, Gly28-H...Asp37-O, qui aident à la cohésion entre les brins β 1 et β 2 pour les deux premières et entre les brins β 4 et β 5 pour la dernière, sont perdues ou transitoires dans les simulations SBD2 (fréquences de contact respectives de 27, 35 et 39 %). Ces pertes peuvent expliquer les RMSD élevés pour les atomes C $^{\alpha}$ des résidus des brins β 1 et β 5 obtenues pour les simulations SBD2 (tableau 4.7). Pour l'hélice α , toutes les liaisons hydrogènes sont conservées sauf la liaison hydrogène Gly58-O...Gly62-H qui est transitoire dans les simulations LD1 et LD2 uniquement (fréquences proches de 50 %). La conservation de la structure de l'hélice α peut provenir, en plus de la conservation des liaisons hydrogènes Arg57-O...Glu61-H et Trp59-O...Val63-H (fréquences supérieures à 90 % pour LD1 et LD2), de la compensation de cette perte par l'apparition d'une liaison hydrogène transitoire Trp59-O...Gly62-H (fréquences moyennes de 20 et 25 % respectivement pour LD1 et LD2). Les fréquences de contact des liaisons hydrogènes ainsi que les RMSD révèlent donc une conservation des structures du feuillet β et de l'hélice α .

Pour l'hélice courte h1, prédite par l'analyse DSSP, les fréquences de contact des liai-

sons hydrogènes Ser39-O...Arg42-H et Arg40-O...Asn43-H sont proches de 30-40 % pour LD1/SBD1 et de 10 % pour LD2/SBD2. La perte de ces liaisons hydrogènes conduit à considérer cette région comme faisant bien partie de la boucle 40 très mobile comme nous le verrons, ce qui est en accord avec la description des structures secondaires de Holt *et al.* pour cette protéine [17]. Ainsi, ces pertes de liaison hydrogène peuvent être reliées aux RMSD élevés de la boucle 40 (voir sous-section 2.1.1.).

Pour l'hélice h2 et contrairement à ce qui est observé pour la région Ser39-Arg42, des valeurs élevées de fréquence sont obtenues pour la liaison hydrogène Ser77-O...Tyr80-H (valeurs supérieures à 90 et 75 % pour, respectivement, les simulations LD et SBD des deux états complexés). En revanche, pour la deuxième liaison hydrogène de l'hélice h2, Pro78-O...Ala81-H, les fréquences sont inférieures à 35 %, excepté pour les simulations LD1 (valeurs proches de 70 %). La perte de cette liaison hydrogène est en partie compensée par la liaison hydrogène Ser77-O...Ala81-H observée pour les simulations SBD des deux états complexés (37 et 46 % pour SBD1 et SBD2) et, dans le cas des simulations LD2 uniquement, par la liaison Pro78-O...Tyr82-H (57 %).

La figure 4.2 montre que les liaisons hydrogènes de l'ensemble LHSC observées dans les boucles sont majoritairement perdues ou transitoires, sauf pour la boucle 60 dans les simulations LD1, SBD1 et LD2. La boucle 40 ne conserve pratiquement aucune des liaisons hydrogènes qu'elle forme dans les structures cristallographiques, ce qui peut être relié aux RMSD élevés observés pour cette boucle (entre 1,21 et 2,52 Å). De même, dans la boucle 80, les liaisons hydrogènes Tyr82-O...Gly86-H, His87-O...Ile90-H et His87-H...Ile90-O sont perdues ou transitoires dans toutes les simulations pour les deux premières et dans les simulations SBD1 et SBD2 pour la dernière. Ainsi, les fréquences de contact faibles des liaisons hydrogènes de la boucle 80 peuvent être reliées aux RMSD élevés observés pour cette boucle (entre 1,38 et 2,00 Å) mais aussi à sa mobilité importante, comme nous le verrons.

Pour terminer l'analyse des liaisons hydrogènes, la formation de liaisons hydrogènes entre des atomes du squelette de la protéine n'appartenant pas à l'ensemble LHSC, a été recherchée pour les simulations LD et SBD des deux états complexés. Alors qu'aucune nouvelle liaison hydrogène ne se forme lors des simulations SBD des deux états, respectivement deux nouvelles liaisons hydrogènes faibles se forment au cours des simulations LD1 et LD2. Pour les simu-

lations LD1, les nouvelles liaisons hydrogènes Asp11-O...Arg13-H et Ser39-O...Asn43-H présentent des distances et des angles respectifs de $2,27 \pm 0,33$ Å/ $139 \pm 20^\circ$ et $2,36 \pm 0,4$ Å/ $126 \pm 18^\circ$ (valeurs respectives dans SC1 de $3,09$ Å/ 92° et $2,15$ Å/ 116°). Pour les simulations LD2, les nouvelles liaisons hydrogènes Val23-O...Lys105-H et Lys52-O...Glu54-H présentent des distances et des angles respectifs de $2,34 \pm 0,08$ Å/ $157 \pm 2^\circ$ et $2,39 \pm 0,43$ Å/ $133 \pm 8^\circ$ (valeurs respectives dans SC2 de $2,55$ Å/ 144° et $3,17$ Å/ 85°). Il est à noter que, à l'exception de Glu54, tous ces résidus ne font pas partie du site de fixation.

Les résultats pour les liaisons hydrogènes entre les atomes du squelette de FKBP12 dans les simulations LD et SBD des deux états complexés indiquent que la majorité des liaisons hydrogènes de l'ensemble LHSC est conservée dans chaque type de simulation. La plupart des liaisons hydrogènes qui sont affaiblies ou perdues correspondent à des liaisons hydrogènes qui se situent dans les boucles 40, et 80. Ces résultats ont pu être reliés aux valeurs élevées de RMSD calculées pour ces boucles (sous-section 2.1.1. p. 87). Toutefois, il est possible que les faibles fréquences de contact de ces liaisons hydrogènes perdues et les RMSD élevés calculés résultent d'erreurs sur les positions atomiques dans les structures cristallographiques. En effet, d'après des études sur les formes complexés de FKBP12, certaines régions du cristal sont déformées en raison probablement de contacts entre les structures de mailles cristallographiques contiguës [89, 98]. Par exemple, dans la structure cristallographique du complexe FKBP12-FK506, de tels effets existent pour la région Tyr82-Ile90 de la boucle 80 qui est en contact avec une partie exposée du ligand présent dans un complexe d'une maille cristallographique contiguë [89]. Dans une étude de la structure du complexe FKBP12-**8**, Nakanishi *et al.* ont effectué des calculs de chimie quantique en utilisant l'approche de fragmentation des orbitales moléculaires (FMO) [98]. Ces auteurs ont obtenu une valeur de RMSD de $0,80$ Å pour les atomes du ligand **8** par rapport à leur position dans la structure cristallographique après une minimisation de l'énergie. Cette valeur élevée de RMSD a été attribuée aux contacts que le ligand **8** fait avec la boucle 80 d'une protéine d'une maille voisine, sans doute avec la même région Tyr82-Ile90 de la boucle 80 que pour le ligand FK506. Ces contacts entre mailles voisines peuvent expliquer la difficulté de maintenir les liaisons hydrogènes putatives de l'ensemble LHSC pour la boucle 80 au cours des simulations LD et SBD des deux états complexés. Ainsi, les RMSD de $\sim 1,9$ Å calculées pour le ligand **8** au cours des simulations LD et SBD de EC1 (sous-section 2.1.1.

p. 87) pourraient également s'expliquer par ces contacts formés entre le ligand **8** et la boucle 80 d'une protéine d'une maille voisine. Par la suite, les fluctuations des positions des atomes de FKBP12 et du ligand dans les deux états complexés sont analysées.

2.1.3. Analyse des fluctuations des atomes de FKBP12 et du ligand dans EC1 et EC2

Les fluctuations des positions des atomes C^α de FKBP12 et des atomes lourds du ligand autour des positions moyennes (RMSF) ont été calculées pour les simulations LD et SBD et sont représentées sur la figure 4.3. Dans un but de comparaison, les facteurs d'agitation thermique (facteurs de Debye-Waller ou facteurs B) issus des structures cristallographiques des deux complexes ont été converties en valeurs de RMSF. L'équation 4.1 permet de calculer la valeur de RMSF d'un atome i ($RMSF_i$) à partir de la valeur du facteur B associée à cet atome (B_i).

$$RMSF_i^2 = \frac{3B_i}{8\pi^2} - F \quad (4.1)$$

Or, la valeur du paramètre F de l'équation 4.1 n'est pas toujours facile à déterminer car elle est associée aux autres facteurs intervenant dans les facteurs B tels que les défauts du cristal, les mouvements persistants d'une partie de la protéine, *etc* [99]. Toutefois, Caves *et al.*, en utilisant les résultats de Ringe et Petsko [100], ont déduit que les RMSF calculés sur plusieurs simulations indépendantes d'un même état sont analogues aux RMSF obtenus à partir des facteurs B, ceci sans tenir compte du paramètre F [92]. Ainsi, les valeurs de RMSF pour SC1 et SC2 ont été calculées d'après l'équation 4.1 en prenant une valeur nulle pour le paramètre F.

Sur la figure 4.3, les RMSF des atomes C^α de la protéine et des atomes lourds du ligand convertis à partir des facteurs B, sans tenir compte du paramètre F, présentent des valeurs très faibles pour SC1 et SC2 (inférieures à 0,8 Å pour l'ensemble des atomes de SC1 et SC2). De plus, ces valeurs très faibles ne varient que très peu entre les structures secondaires régulières et les boucles et entre les parties de cœur des ligands et les parties périphériques. Or, les boucles 40 et 80 sont connues expérimentalement pour être très mobiles, donc les RMSF de ces régions devraient donc être plus élevés que pour les régions des brins β par exemple. Une explication possible vient du fait que les valeurs des facteurs B ont tendance à sous-estimer la fluctuation des atomes impliqués dans des régions flexibles de la protéine, comme les boucles, parfois de plusieurs angströms [101]. Toutefois, dans le cas présent, il semblerait que l'explication provienne

du fait que les structures cristallographiques SC1 et SC2 ont été obtenues respectivement à 277 K et à 110 K. Bien que pour l'analyse de SC1 les mesures aient été effectuées à 300 K, il est possible que le temps d'équilibration thermique entre la conservation et la mesure n'ait pas été suffisant. Ainsi, pour au moins une de ces deux raisons, les comparaisons entre les valeurs expérimentales de RMSF et celles mesurées au cours des simulations ne peuvent pas être faites ici.

Pour les RMSF des atomes C^α , les valeurs associées aux structures secondaires régulières et à l'hélice h2 sont inférieures à $0,8 \text{ \AA}$ ⁱ pour les simulations LD et SBD des deux EC. Pour les boucles, les RMSF associés aux atomes C^α des boucles 30, 50 et 60 sont respectivement proches de $1\text{-}1,2 \text{ \AA}$, inférieurs à 1 \AA et inférieurs à $0,6 \text{ \AA}$ pour l'ensemble des simulations des deux EC. Pour la boucle 10, alors que pour les simulations LD1, SBD1 et LD2, les RMSF associés aux atomes C^α sont inférieurs à $0,8 \text{ \AA}$, pour SBD2 les valeurs dépassent $\sim 1,2 \text{ \AA}$ pour la région Pro9-Thr14, allant jusqu'à $\sim 1,5 \text{ \AA}$ pour le résidu Asp11. Ces différences de mobilité pour la boucle 10 pour les simulations SBD2 par rapport aux simulations LD1, SBD1 et LD2, sont comparables avec les différences de RMSD calculés pour cette boucle (RMSD de la boucle 10 pour SBD2 jusqu'à $1,6 \text{ \AA}$ plus élevé que pour les autres simulations). Pour la boucle 40, les RMSF associés aux atomes C^α sont inférieurs à $\sim 0,7 \text{ \AA}$ pour les simulations LD1 et LD2, et supérieurs à 1 \AA pour SBD1 et SBD2 avec des valeurs maximales obtenues pour le résidu Asn43 (RMSF de $1,33$ et $1,85 \text{ \AA}$ respectivement pour SBD2 et SBD1). Pour la boucle 80, les RMSF obtenus dans les simulations LD et SBD pour les deux EC sont similaires avec, en particulier pour le résidu Gly89, des valeurs maximales proches de $1,2$ et de $1,4 \text{ \AA}$ respectivement dans LD2 et SBD2, et dans LD1 et SBD1.

Ces résultats sur les fluctuations des atomes C^α de la protéine sont en accord avec deux études dans lesquelles les structures cristallographiques des complexes formés par FKBP12 avec différents ligands ont été alignées [103, 104]. Ces alignements fournissent une représentation de la flexibilité du squelette de FKBP12 après complexation avec un ligand. Un des résultats les plus importants qui émerge de ces alignements est que tous ces complexes partagent des caractéristiques géométriques communes et présentent une mobilité accrue pour les atomes du

i. Pour des simulations d'une protéine à 300 K, des valeurs proches de $0,75\text{-}1 \text{ \AA}$ sont typiquement observées [102].

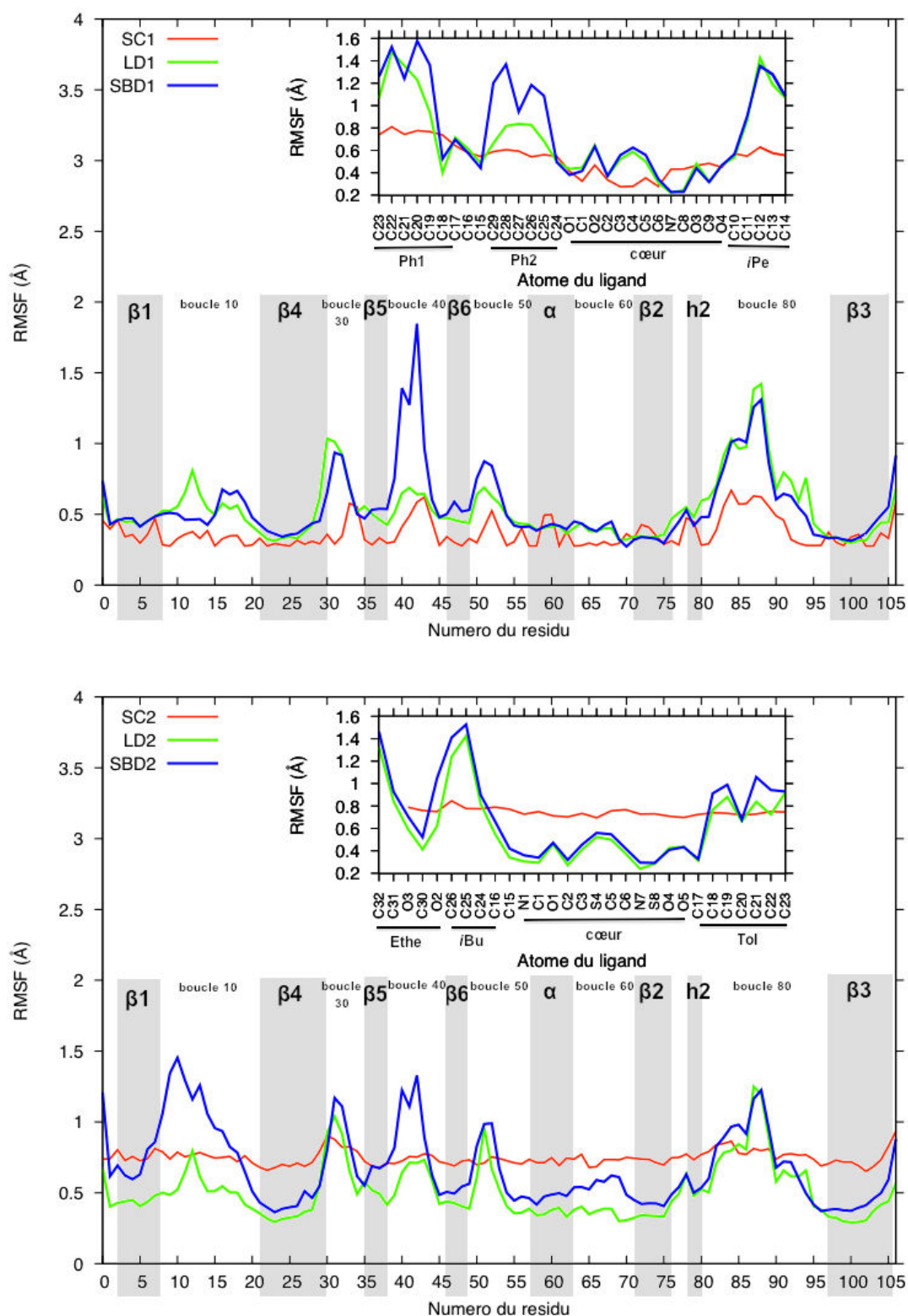


FIGURE 4.3 – Valeurs de RMSF des atomes C^α en fonction du numéro du résidu et des atomes lourds du ligand en fonction de leurs noms (encart) pour EC1 et SC1 (haut), et pour EC2 et SC2 (bas). Les RMSF des structures secondaires régulières et de l'hélice h2 ont été ombrés. Les parties des ligands ont également été indiquées.

squelette des résidus des boucles 10, 30, 40, 50 et 80. De plus, il a été montré que malgré leur tendance à se structurer, les boucles 40 et 80, décrites comme les plus flexibles dans la protéine non-complexée, conservent une certaine mobilité lors de la complexation de FKBP12 avec différents ligands [28, 94, 95, 89, 29, 97]. Plus précisément, la mobilité de la boucle 40 dépend de la nature du ligand complexé à FKBP12. D'après une comparaison des structures cristallographiques des complexes FKBP12-FK506 et FKBP12-rapamycine, l'absence de contacts entre la rapamycine et la boucle 40 est considérée comme responsable d'une mobilité accrue de cette boucle par rapport à ce qui est observé pour le complexe formé avec FK506 qui interagit avec le résidu Arg42 de la boucle 40 [89]. Dans SC1 et SC2 et au cours des simulations LD et SBD de EC1 et de EC2, les ligands **8** et **308** ne forment pas de contacts avec la boucle 40 (distances interatomiques supérieures à 6 Å). En se basant sur les conclusions ci-dessus issues de la comparaison des complexes FKBP12-FK506 et FKBP12-rapamycine, des valeurs élevées de fluctuations peuvent être anticipées pour les résidus de la boucle 40. Ainsi, les profils de RMSF des simulations SBD1 et SBD2 semblent plus en accord avec les données expérimentales que ceux des simulations LD1 et LD2 pour les atomes C α des résidus de la boucle 40.

Pour chacun des complexes EC1 et EC2, les RMSF obtenus en LD et SBD pour les atomes lourds du ligand sont similaires, sauf pour la partie Ph2 de **8**. Cette partie présente des RMSF diminuées de 0,4 à 0,7 Å pour les simulations LD1 par rapport aux simulations SBD1. Pour EC2, les profils sont presque totalement identiques sauf pour l'atome **308**-O2 qui présente un RMSF diminué d'environ 0,4 Å pour LD2 par rapport à SBD2. Sur la figure 4.3, il est également possible de constater que les RMSF associés aux atomes lourds des parties périphériques sont plus élevés de 0,4 à 1,0 Å par rapport à ceux associés aux atomes lourds des parties de cœur (sauf pour la partie Ph2 dans les simulations LD1, l'atome **308**-O2 dans LD2 et les atomes **308**-O3 et **308**-C30 dans LD2 et SBD2). Ces résultats montrent que, comme attendue, les parties périphériques des ligands sont les plus mobiles et, qu'excepté pour la partie Ph2 et pour l'atome **308**-O2, les simulations LD permettent d'obtenir des fluctuations pour les atomes lourds du ligand qui sont équivalentes à celles observées pour les simulations SBD.

2.2. Analyse des interactions formées entre FKBP12 et le ligand dans EC1 et EC2

Afin d'évaluer la stabilité de la position du ligand dans le site de fixation de FKBP12, les distances de contact entre la protéine et le ligand ont été calculées pour les simulations LD et SBD des deux états complexés. Cette analyse permet de faire ressortir deux classes de contacts. La première classe représente les contacts conservés et fait apparaître les interactions permanentes formées entre deux atomes définis dans cette étude comme deux atomes séparés au plus d'une distance moyenne de 4 Å. Ces interactions permanentes formées entre deux atomes ont été comparées avec les interactions observées dans la structure cristallographique afin de vérifier que la position du ligand dans le site de fixation de FKBP12 est équivalente à celle observée expérimentalement. La deuxième classe observée dans les simulations représente les contacts interatomiques instantanés, désignés ci-après contacts ou interactions transitoires, se formant entre un atome d'une partie du ligand et un atome d'un résidu de FKBP12. Lors du calcul de leur distance moyenne de contact sur une simulation, le temps de formation d'un contact entre deux atomes X de la protéine et Y du ligand n'est pas suffisant pour avoir une moyenne de distance inférieure à 4 Å. Nous verrons que pour certains de ces contacts transitoires de type $X \cdots Y$, l'atome Y s'interchange régulièrement avec un autre atome équivalent Z du ligand. Le résultat est qu'en moyenne, ni Y, ni Z ne fait d'interaction permanente avec X mais la partie (YZ) du ligand reste toujours en contact avec X. Ce type d'interaction nous a conduits à considérer, en plus des interactions interatomiques permanentes, des interactions transitoires formées par des groupes d'atomes où la somme de l'ensemble des contacts réalisés entre tous les atomes d'une partie du ligand et tous les atomes d'un résidu de la protéine est considérée. Sur la figure 4.4, se trouvent respectivement deux interactions transitoires entre les groupes d'atomes présents dans les cadres A (la partie Ph1 de **8** et le résidu Tyr82) et B (la partie Ph1 et le résidu Ile56). Le nombre d'interactions décomptées entre la partie Ph1 et le résidu Tyr82 correspond à la somme des contacts formés entre les atomes de la partie Ph1 et les atomes du résidu Tyr82 (*idem* avec le résidu Ile56). Ainsi, en regardant le cadre A, il ressort que la partie Ph1 et le résidu Tyr82 forment deux interactions transitoires (de même pour la partie Ph1 et Ile56 dans le cadre B). Les contacts sont décomptés dans chaque structure d'une simulation et une moyenne est obtenue pour chaque simulation. La moyenne d'ensemble est finalement considérée dans les

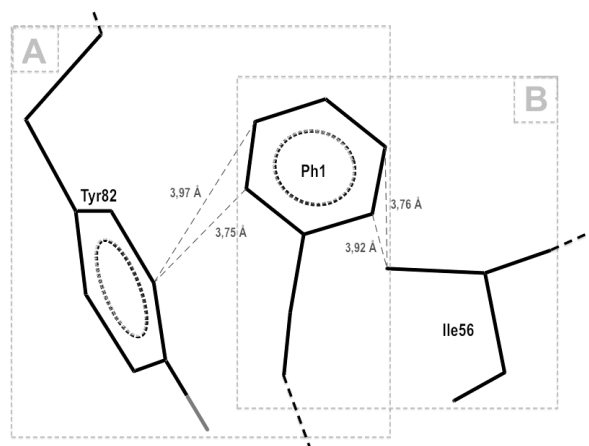


FIGURE 4.4 – Ensembles des contacts formés entre la partie Ph1 du ligand **8** avec (A) le résidu Tyr82 et (B) le résidu Ile56 dans SC1. Les distances de contact ne dépassant pas 4 Å pour la séparation entre un des atomes du résidu Tyr82 ou du résidu Ile56 avec un des atomes de la partie Ph1 sont représentées en pointillé.

analyses qui suivent.

2.2.1. Interactions permanentes

Afin de mettre en évidence les interactions permanentes (principalement de types van der Waals ou liaisons hydrogènes) formées entre un atome de la protéine et un atome du ligand durant les simulations LD et SBD des deux états complexés, un critère de contact qui correspond à une distance de séparation entre deux atomes lourds ne dépassant pas 4 Å a été choisi. Ces distances interatomiques sont des moyennes d'ensemble calculées à partir des moyennes temporelles issues d'un même type de simulation, LD ou SBD, d'un état complexé. Le critère de contact défini précédemment a également été utilisé afin d'extraire de SC1 et SC2 les couples d'atomes formant des interactions entre la protéine et le ligand. Dans SC1, un total de 57 couples a été extrait tandis que dans SC2 le total s'élève à 74 couples. Pour chaque état complexé, la comparaison des valeurs de distance séparant les atomes de chaque couple mesurées dans les structures cristallographiques avec les valeurs moyennes obtenues pour les simulations LD et SBD est présentée sur la figure 4.5 p. 114.

Dans les structures cristallographiques, la majorité des interactions sont formées entre des atomes de la protéine et la partie de cœur du ligand (45 sur 57 dans SC1 et 50 sur 74 dans SC2).

Parmi ces interactions, se trouvent celles formées par les couples d'atomes lourds impliqués dans les liaisons hydrogènes **8**-O3...Tyr82-O^η et **8**-O2...Ile56-N, et **308**-O2...Tyr82-O^η et **308**-O1...Ile56-N. Dans les structures cristallographiques, les parties périphériques des ligands forment beaucoup moins d'interactions en comparaison du cœur : cinq, quatre et trois pour, respectivement, les parties Ph1, le bras propyle C17-C16-C15 et *i*Pe dans SC1 ; neuf, trois et 12 pour, respectivement, les parties Ethe, *i*Bu et l'atome C15, et Tol dans SC2. De plus, les plus grands nombres de contacts font intervenir les résidus Trp59 et Tyr82 (respectivement 12 et 15 dans SC1, et 14 et 15 dans SC2). En fait, près de la moitié des contacts est formée par le fond de la cavité principale du site de fixation de FKBP12 (noyau indole du résidu Trp59) et par la petite cavité latérale formée par la boucle 80 défini par les chaînes latérales des résidus Tyr82, His87, Ile90 et Ile91 (nombre total de contacts pour ces deux groupes de résidus de 27 et 36, respectivement dans SC1 et SC2).

Pour les parties de cœur des ligands, des résultats similaires sont obtenus pour les deux types de simulation des deux états complexés. Quand les distances de contact impliquant les atomes du cœur des ligands sont comparées entre les deux types de simulation, les différences entre ces distances sont inférieures à $\sim 0,3$ Å pour chacun des états EC1 et EC2. Seulement deux et sept exceptions sont trouvées respectivement pour EC1 et EC2. Dans LD1, les distances de contact **8**-C5...Phe46-C^ζ et **8**-O4...Phe36-C^{δ1} (respectivement C5-46CZ et O4-36CD1 sur la figure 4.5 (A)) sont plus élevées par rapport à leur équivalent dans SBD1 respectivement de $\sim 0,4$ et $\sim 0,5$ Å. Dans LD2, les distances de contact **308**-S4...Phe46-C^ζ, **308**-O4...Tyr82-C^{ε1} et **308**-O5...Phe99-C^{ε2} (respectivement S4-46CZ, O4-82CE1 et O5-99CE2 sur la figure 4.5 (B)) sont plus élevées que leur équivalent dans SBD2 respectivement de $\sim 0,6$, $\sim 0,6$ et $\sim 0,4$ Å tandis que celles des contacts **308**-O4...Phe36-C^ζ, **308**-O4...Ile91-C^δ, **308**-O5...Tyr26-C^ζ et **308**-O5...Tyr26-O^η (respectivement O4-36CZ, O4-91CD, O5-26CZ et O5-26OH sur la figure 4.5 (B)) sont plus faibles que leurs équivalents dans SBD1, respectivement de $\sim 0,6$, $\sim 1,2$, $\sim 0,4$ et $\sim 0,4$ Å. Nous remarquons donc que, pour l'ensemble des couples, les distances de contact qui diffèrent le plus entre les deux types de simulation font intervenir le plus souvent des résidus aromatiques (Phe36, Phe46, Phe99 et Tyr82).

Dans EC1, pour les contacts formés par la partie Ph1 liée au bras propyle, les distances diffèrent de manière significative entre les deux types de simulation tandis que des valeurs

similaires sont trouvées pour les contacts formés par la partie *i*Pe. Dans EC2, les distances moyennes diffèrent de la même manière pour l'ensemble des parties périphériques de **308**. Pour la liaison hydrogène **308**-O2...Tyr82-H^{*n*}, la distance issue de SBD2 est supérieure de 0,6 Å à celle issue de LD2, conduisant à la rupture de cette liaison dans le cas des simulations SBD (distance de $2,54 \pm 0,22$ Å) remplacée par un contact de van der Waals entre **308**-O2...Tyr82-O^{*n*} (O2-82OH sur la figure 4.5 (B)). À l'inverse au cours des simulations LD2, cette liaison hydrogène est conservée (valeurs moyennes de distance et d'angle de $1,92 \pm 0,02$ Å et $161 \pm 1^\circ$). Globalement, pour EC1 et EC2, les parties périphériques des deux ligands sont celles dont les distances diffèrent le plus des valeurs mesurées dans les structures cristallographiques, comme discuté par la suite.

Afin de pouvoir comparer les distances de contact expérimentales (mesurées sur les structures cristallographiques) avec celles issues des simulations LD et SBD des deux états complexés, nous allons fournir une estimation de l'erreur attendue sur les positions atomiques dans une structure cristallographique obtenue à une résolution de 2 Å. Etant donné que cette erreur est estimée approximativement à une valeur comprise entre un cinquième et un dixième de la résolution [105, 106], celle-ci est donc comprise dans l'intervalle [0,2 ; 0,4 Å] ce qui entraîne une erreur estimée sur les distances de contact comprise dans l'intervalle [0,4 ; 0,8 Å].

Pour les contacts formés par la partie de cœur de **8**, 18 distances sont supérieures de plus de 0,4 Å par rapport à celles de référence (mesurées dans SC1). Pour EC1, les différences avec les valeurs expérimentales pour 12 des 18 distances sont dans l'intervalle [0,4 ; 0,5 Å] dans au moins un des deux types de simulation (couples marqués d'une seule étoile de même couleur, vert pour LD, rouge pour SBD, et noir pour les deux types sur l'axe des abscisses de la figure 4.5). Pour les six autres distances qui diffèrent par une valeur comprise dans l'intervalle [0,5 ; 0,8 Å], nous constatons que les atomes de FKBP12 intervenant dans les contacts font partie d'un cycle benzénique (chaîne latérale des résidus Tyr26 et Phe46).

Pour les contacts formés par la partie de cœur de **308**, 24 distances sont supérieures de plus de 0,4 Å par rapport à celles de référence (mesurées dans SC2). Pour EC2, les différences pour 11 des 24 distances sont dans l'intervalle [0,4 ; 0,6 Å] pour au moins un des deux types de simulation (couples marqués par une et deux étoiles de même couleur sur la figure 4.5(B)). Pour sept des 24 distances de EC2 retrouvées dans l'intervalle [0,6 ; 0,8 Å], elles impliquent systé-

matiquement un noyau aromatique (indole pour le résidu Trp59 et benzénique pour les résidus Phe36, Phe46 et Tyr82 ; couples marqués par trois et quatre étoiles sur la figure 4.5(B)). Pour les six couples restants, les différences par rapport aux distances de référence sont supérieures à 0,8 Å ; deux de ces couples sont concernés pour LD2 et quatre pour SBD2 (couples marqués par cinq étoiles sur la figure 4.5(B)). Parmi ces six couples, seuls les couples **308**-S4...Phe46-C ζ dans LD2 et **308**-O4...Ile91-C δ dans SBD2 diffèrent de leurs valeurs mesurées dans SC2 de plus de 0,9 Å (respectivement de 0,91 et 1,46 Å).

Pour les parties périphériques des ligands (hormis le bras propyle C17-C16-C15), les différences entre les valeurs issues des simulations LD ou SBD et celles expérimentales sont plus élevées que pour la partie de cœur des ligands. Pour la partie *i*Pe de **8** (distances sur la figure 4.5 (A) impliquant les atomes **8**-C13 et **8**-C14), ces différences résultent de rotations autour de la liaison covalente C9-C10 observées au cours des simulations (barrière d'énergie de 1,4 kcal/mol). Pour la partie Ph1 de **8**, (distances impliquant les atomes C23-C19, hormis C21 sur la figure 4.5 (A)), ces différences s'expliquent par une mobilité également importante du cycle en raison d'une rotation facile autour de la liaison covalente C18-C17 (barrière de 0,5 kcal/mol), combinée à des oscillations rotationnelles autour des liaisons covalentes C17-C16 et C16-C15, amplifiant le déplacement du cycle. Dans la sous-section 2.1.3. p. 100, les valeurs de RMSF calculées pour les parties Ph1 et *i*Pe ont été discutées ; les valeurs élevées indiquent en effet une importante mobilité.

Pour les parties périphériques de **308** dans EC2, excepté pour les distances impliquant l'atome Tyr82-O η (C30-82OH, C17-82OH sur la figure 4.5 (B)) qui présentent des différences comprises dans l'intervalle]0,0 ; 0,7 Å], les différences pour les valeurs issues des simulations par rapport à celles expérimentales sont élevées avec des différences allant de 0,8 à 2,9 Å pour au moins un des deux types de simulation (différence maximale de 2,21 et 2,87 Å pour la distance **308**-C32...Glu54-O respectivement dans les simulations LD2 et SBD2 ; distance C32-54O sur la figure 4.5 (B)). Pour la partie Ethe de **308** (distances sur la figure 4.5 (B) impliquant l'atome C32), ces différences résultent de rotations autour de la liaison covalente C31-O3 observées au cours des simulations (barrière énergétique pour la torsion de 0,9 kcal/mol). Ces rotations correspondent au franchissement des faibles barrières autour de 238° et 493° (voir figure 3.11 p. 69). Pour la partie Tol de **308** (distances sur la figure 4.5 (B) impliquant les atomes C17 à

C23, hormis C19), ces différences s'expliquent par une mobilité du cycle en raison d'une rotation facile autour de la liaison S8-C17 résultant du franchissement de la faible barrière autour de 277° (barrière énergétique de 0,3 kcal/mol ; voir commentaires dans la sous-section 2.4.3. p. 59), combinée à des oscillations rotationnelles autour de la liaison covalente N7-S8, amplifiant le déplacement du cycle (qui entraîne un déplacement du groupement méthyle du C23). Dans la sous-section 2.1.3. p. 100, les valeurs de RMSF calculées pour les parties Ethe (notamment pour l'atome **308**-C32) et Tol indique une mobilité importante pour ces parties.

En conclusion, seules trois interactions permanentes qui n'existent pas dans SC1 sont formées au cours des simulations LD1 et SBD1 tandis qu'une seule nouvelle interaction se forme au cours des simulations SBD2. Au cours des simulations LD1, les nouveaux contacts **8**-C25...Glu54-O et **8**-O2...Ile56-C ^{β} représentent des interactions permanentes avec des distances respectives de $3,59 \pm 0,09$ et $3,96 \pm 0,02$ Å. Au cours des simulations SBD1, seul le nouveau contact **8**-C4...Phe46-C ^{ζ} apparaît comme une interaction permanente avec une distance de $3,99 \pm 0,05$ Å. Au cours des simulations SBD2, le nouveau contact **308**-O5...Phe36-C ^{δ^2} représente une interaction dont la distance est de $3,99 \pm 0,40$ Å. Toutefois, la valeur élevée de la déviation standard amène à considérer que cette interaction n'est pas présente dans toutes les simulations. Ainsi, le maintien global des interactions observées dans les structures cristallographiques, surtout pour les parties de cœur des ligands, ajouté au faible nombre d'interactions nouvelles, indiquent une position conservée pour chacun des ligands dans le site de fixation de FKBP12 lors des simulations LD et SBD des deux états complexés. Par la suite, les interactions sont regroupées par résidu et par partie des ligands afin d'analyser les interactions transitoires entre les groupes d'atomes.

2.2.2. Interactions transitoires entre deux groupes d'atomes

Afin d'obtenir une vision complète des interactions formées entre la protéine et le ligand dans les états complexés, les interactions transitoires (principalement de types hydrophobes ou recouvrement orbitalaire) formées entre les deux partenaires ont été repertoriées et analysées par groupes d'atomes.

Pour pouvoir analyser les interactions transitoires entre groupes d'atomes de FKBP12 et du ligand dans les deux états complexés, des cartes de nombre d'interaction ont été générées pour

les deux types de simulation des deux états complexés. Ces cartes présentent le nombre total d'interaction (somme des interactions transitoires entre deux groupes d'atomes résidu-ligand et des interactions permanentes entre les atomes de ces deux groupes) entre chaque partie du ligand et résidu de FKBP12. Afin de générer ces cartes, trois étapes sont nécessaires. Au cours de la première étape, pour EC1 et EC2, le nombre de contacts moyen entre chaque partie du ligand et chaque résidu de FKBP12 est calculé à partir de toutes les structures d'une simulation donnée, LD ou SBD (comme effectué précédemment pour les contacts formés entre la partie Ph1 et les résidus Tyr82 et Ile56 dans la figure 4.4 p. 103). Pour obtenir une description plus détaillée des interactions transitoires, les parties de cœur des ligands ont été divisées en plusieurs sous-parties (voir figure 4.1) : le groupement ester (O1C1O2), le cycle central (C2N7) et les deux groupements cétones (C8O3 et C9O4) pour le ligand **8**, la fonction amide (C15N1C1O1), le cycle central (C2SN7) et le groupement sulfonyle (S8O4O5) pour le ligand **308**. Durant la deuxième étape, une moyenne d'ensemble de ce nombre est calculée à partir de l'ensemble des nombres calculés à partir de toutes les simulations d'un même type pour un état complexé donné. De telles moyennes d'ensemble pour tous les contacts sont calculées pour les deux types de simulation des deux états complexés. Dans un but de comparaison avec les données expérimentales, les nombres d'interactions formés entre chaque partie ou sous-partie du ligand et chaque résidu de la protéine sont calculés dans les structures cristallographiques (dans ce cas, ces interactions sont considérées dans la suite comme permanentes). La troisième étape correspond à la création des cartes pour la structure cristallographique et pour les deux types de simulation d'un état complexé. Les valeurs reportées considèrent tous les résidus formant un contact avec le ligand soit dans la structure cristallographique, soit dans au moins une des structures d'un des deux types de simulation de l'état complexé considéré. Par exemple, dans SC1 aucune interaction n'est formée entre le résidu His87 et une des (sous-)parties du ligand **8**. Or, au cours des simulations LD1 et SBD1, des interactions sont retrouvées entre le résidu His87 et les parties Ph1 et *i*Pe. Donc, pour construire les cartes de nombre d'interactions pour SC1, LD1 et SBD1, le résidu His87 a été inclus. Ceci permet de faciliter la comparaison entre les différentes données obtenues. Les cartes de nombre d'interactions observées au cours des simulations LD et SBD des deux états complexés et sur les structures cristallographiques sont présentées sur la figure 4.6 p. 116.

En les générant de la manière décrite précédemment, ces cartes ne permettent pas de différencier les interactions transitoires des interactions permanentes. Cependant, il est possible de soustraire le nombre d'interactions permanentes trouvées entre une partie du ligand et un résidu de la protéine (celles discutées à partir de la figure 4.5 p. 114) aux valeurs présentées sur les cartes afin d'obtenir uniquement le nombre d'interactions transitoires. Ces cartes permettent d'obtenir une vision globale des interactions formées entre FKBP12 et le ligand fournissant ainsi des informations sur la position générale du ligand dans le site de fixation de FKBP12.

Pour chacun des états complexés, la comparaison de ces cartes de nombre d'interactions totales (permanentes et transitoires) révèlent des similitudes entre (i) les simulations LD et SBD et (ii) les structures cristallographiques et les simulations LD et SBD. L'analyse des valeurs numériques utilisées pour établir ces cartes présentées sur la figure 4.6 permet d'observer que le ligand **8** forme 35 et 46 interactions respectivement dans les simulations LD1 et SBD1, et que le ligand **308** forme 41 et 53 interactions respectivement dans les simulations LD2 et SBD2. Ces nombres sont plus faibles que les 57 et 74 interactions «permanent» trouvées dans les structures cristallographiques respectivement de SC1 et SC2. Les parties des ligands qui forment le plus d'interaction sont les sous-parties qui constituent le cœur (26 et 34 respectivement dans LD1 et SBD1, et 30 et 32 respectivement dans LD2 et SBD2). De plus, les résidus qui forment en général le plus d'interaction avec les ligands sont Trp59 et Tyr82 (respectivement sept et neuf dans LD1, sept et 11 dans SBD1, huit et huit dans LD2 et, sept et huit dans SBD2). Pour les interactions formées par les sous-parties du cœur des ligands, les résultats correspondent quasiment parfaitement aux nombres d'interactions permanentes observées sur la figure 4.5, celles-ci correspondant à des contacts pour lesquels les valeurs moyennes ne dépassent pas 4 Å. Ceci révèle que les parties de cœur des ligands ne forment pas ou très peu d'interaction transitoire avec FKBP12. Ainsi, ce résultat confirme la conclusion précédente issue des analyses des distances et qui est la conservation de la position native de ces parties de cœur au cours des simulations LD et SBD des deux états complexés. Parmi les interactions observées sur les cartes, un grand nombre d'interactions transitoires apparaît pour les parties périphériques des deux ligands.

Malgré les similitudes entre les nombres d'interactions formées par les parties de cœur sur les cartes présentées sur la figure 4.6, des différences sont observées pour les parties périphériques des deux ligands. Tout d'abord, les nombres moyens d'interactions totales formées au

cours des simulations LD sont inférieurs à ceux obtenus pour les simulations SBD. Puisque ces parties périphériques des deux ligands ne forment pas ou peu d'interactions permanentes dans les simulations LD et SBD (excepté pour l'atome **308-O2** de la partie Ethe dans les simulations LD2), les interactions pour ces parties dans la figure 4.6 correspondent principalement à des interactions transitoires. Nous pouvons donc déduire que moins d'interactions transitoires sont formées au cours des simulations LD comparées aux simulations SBD. Ensuite, pour la partie Ph1 dans EC1, une différence est visible entre les simulations LD et SBD pour les interactions transitoires qu'elle forme (aucune qui est permanente d'après la figure 4.5(A)). Ces différences d'interaction traduisent une différence des positions balayées par la partie Ph1 dans le site de fixation, comme présenté sur la figure 4.7 (A) p. 117. Alors que dans les simulations LD1, cette partie interagit avec le résidu Tyr82 et ces résidus positionnés à sa gauche dans la figure, principalement les résidus Glu54, Val55 et Ile56, dans les simulations SBD1, la partie Ph1 interagit avec le résidu Tyr82 et des résidus positionnés à sa droite (Gly86 et His87). Pour EC1, deux autres différences entre SC1 et LD1 ou SBD1 sont visibles pour les parties Ph2 et *i*Pe de **8**. Dans SC1, la partie Ph2 ne forme aucune interaction avec la protéine. En revanche, au cours des simulations LD1 et SBD1, cette partie forme des interactions soit permanentes (figure 4.5 (A)), soit transitoires avec notamment le résidu Glu54 (figure 4.7 (B)). Pour la partie *i*Pe, le même constat peut être fait avec la formation d'interactions transitoires avec les résidus Phe36, Ile90 et/ou Ile91 lors des simulations LD1 et SBD1 qui ne sont pas présentes dans SC1 (figure 4.7 (C)).

Pour EC2, seules les parties Ethe et Tol du ligand **308** présentent des différences entre les simulations LD2 et SBD2 ou entre celles observées dans les deux types de simulation et SC2. Pour la partie Ethe, les différences entre les simulations LD2 ou SBD2 et SC2 sont dues à l'apparition d'interactions transitoires avec le résidu His87, comme observé dans l'une des deux conformations de chaque type de simulation (LD2 position 2 sur les figures 4.7 (D) et SBD2 position 2 sur 4.7 (E))^j.

Pour la partie Tol, lors des simulations LD2 et SBD2, les interactions «permanentes» formées par cette partie avec le résidu Ile90 dans SC2 sont remplacées par des interactions transi-

^j. Sur la figure 4.7 (E), il est possible d'observer une des raisons de la perte de la liaison hydrogène formée entre les atomes **308-O2** et Tyr82-H^η (figure 4.5 (B)). L'atome **308-O2** s'éloigne du résidu Tyr82 conjointement au mouvement permettant de rapprocher les atomes **308-O3** et **308-C32** du résidu His87.

toires formées avec les résidus Ile90 et Ile91. De plus, la perte des interactions «permanentes» formées dans SC2 entre la partie Tol et les résidus Tyr82 et His87 (figure 4.5(B)) semble être compensée par un nombre moyen équivalent en nombre d'interactions transitoires avec ces deux résidus et le résidu Phe36 dans SBD2, alors que dans les simulations LD2 le nombre moyen d'interaction est beaucoup moins important (figure 4.7 (F)).

2.3. Conclusions des analyses de FKBP12 et du ligand dans EC1 et EC2

Les résultats des RMSD, des conservations des liaisons hydrogènes de l'ensemble LHSC, des RMSF et des interactions permanentes et transitoires formées entre FKBP12 et le ligand au cours des simulations LD et SBD des deux états complexés sont en accord avec les données expérimentales. En effet, les structures générales de FKBP12 et des ligands **8** et **308** ne présentent pas de déformations majeures par rapport à leur structure expérimentale respective. Toutefois, de légères déformations sont observées pour la boucle 80 au cours des simulations par rapport aux structures cristallographiques. Cependant, ces déformations pourraient être attribuées à des contacts des mailles cristallographiques contiguës, comme observé dans des études sur les complexes formées par FKBP12 avec FK506, la rapamycine ou le ligand **8** [89, 98]. L'analyse des liaisons hydrogènes formées entre des atomes du squelette de FKBP12 dans les structures cristallographiques (ensemble LHSC) montrent une conservation des structures secondaires au cours des simulations.

Pour les RMSF, les résultats montrent des valeurs élevées pour les atomes C $^{\alpha}$ des résidus des boucles 40 et 80 ainsi que pour les atomes lourds des parties périphériques des deux ligands. Pour les boucles 40 et 80, les valeurs élevées de RMSF sont en accord avec de précédentes études qui ont montré qu'elles possèdent une forte mobilité [28, 94, 95, 89, 96, 97]. Pour les parties périphériques des ligands, les valeurs de RMSF élevées indiquent des mobilités accrues qui peuvent s'expliquer par les faibles barrières énergétiques associées aux rotations autour des liaisons C18-C17, C24-C15 et C9-C10 respectivement pour les parties Ph1, Ph2 et *i*Pe de **8**, et O3-C31, C16-C15, et S8-C17 respectivement pour les parties Ethe, *i*Bu et Tol de **308** (barrières énergétiques inférieures à 1,6 kcal/mol). Pour S8-C17, il s'agit uniquement du franchissement de la faible barrière autour de 277° et pour O3-C31 des faibles barrières au-

tour de 238° et 493°. Ces rotations permettent à ces parties périphériques de balayer un grand nombre de conformations alternatives. Ainsi, malgré la réduction de l'entropie de conformation due à la complexation, les ligands conservent une certaine entropie de part la mobilité de leurs parties périphériques dans les deux états complexés, contribuant, au moins en partie, aux bonnes propriétés de complexation de ces ligands.

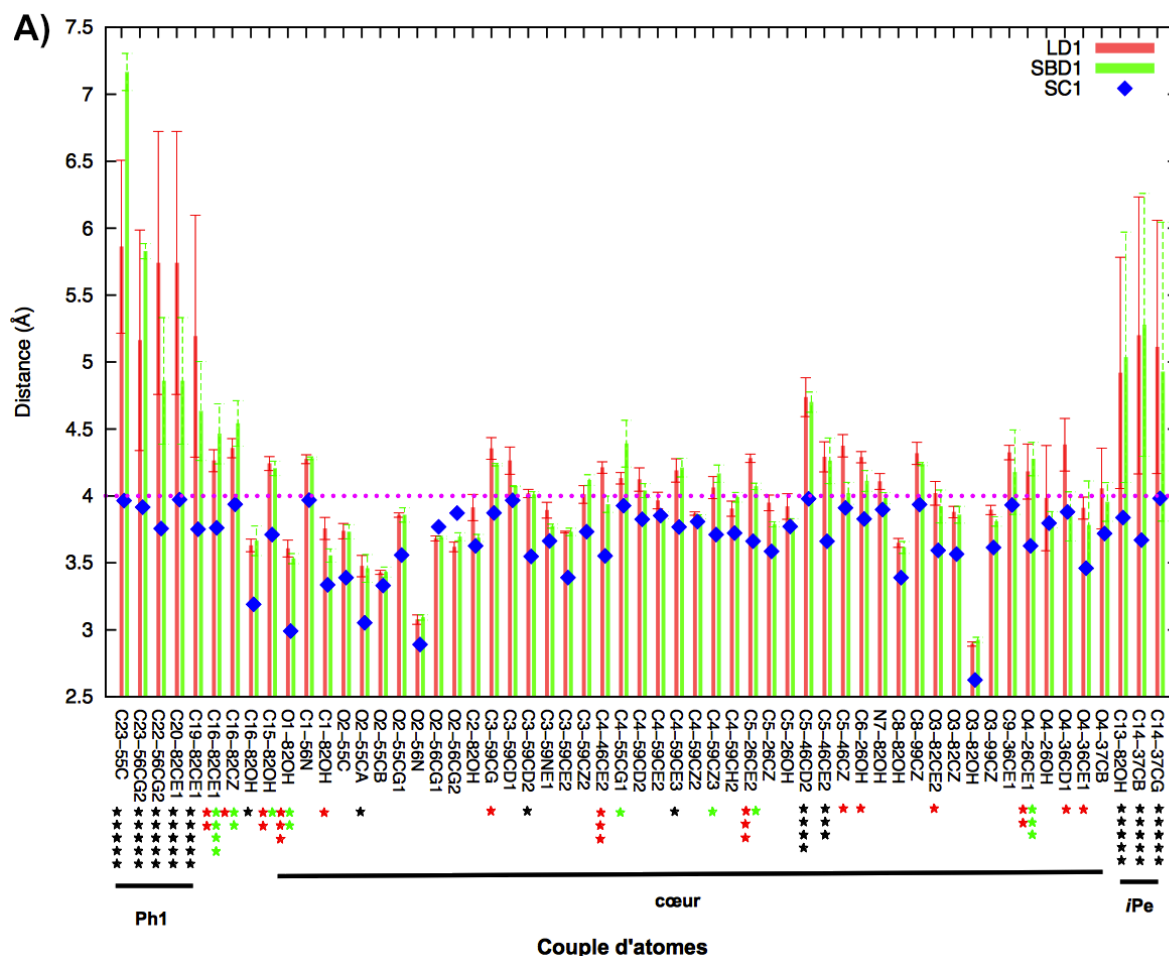
L'analyse des interactions formées entre FKBP12 et le ligand montrent que la position observée expérimentalement pour le ligand est maintenue dans le site de fixation au cours des simulations LD et SBD des deux états complexés. Toutes les interactions (permanentes et transitoires) calculées à partir des simulations SBD sont résumées sur les schémas de la figure 4.8 p. 118 pour les deux états EC1 et EC2 caractérisés. Les positions correctement reproduites pour les deux ligands peuvent être attribuées, au moins en partie, aux efforts consacrés à l'optimisation des paramètres du champ de force CHARMM22 pour les ligands **8** et **308**, notamment pour les paramètres d'angle dièdre qui sont cruciaux pour une description réaliste des mobilités et des contacts pour ces ligands. De plus, la comparaison des interactions formées entre FKBP12 et le ligand dans SBD1 et SBD2 montrent que les parties équivalentes des ligands **8** et **308** (Ph1 pour **8** avec Ethe pour **308**, Ph2 avec *i*Bu, O1C1O2 avec C15N1C1O1, C2N7 avec C2SN7, C8O3 et C9O4 avec S8O4O5, et *i*Pe avec Tol) interagissent à quelques exceptions près avec les mêmes résidus de FKBP12 (figure 4.8). D'après ce résultat, il est possible de confirmer que dans les deux états complexés, les deux ligands se situent dans une position relative similaire par rapport au site de fixation.

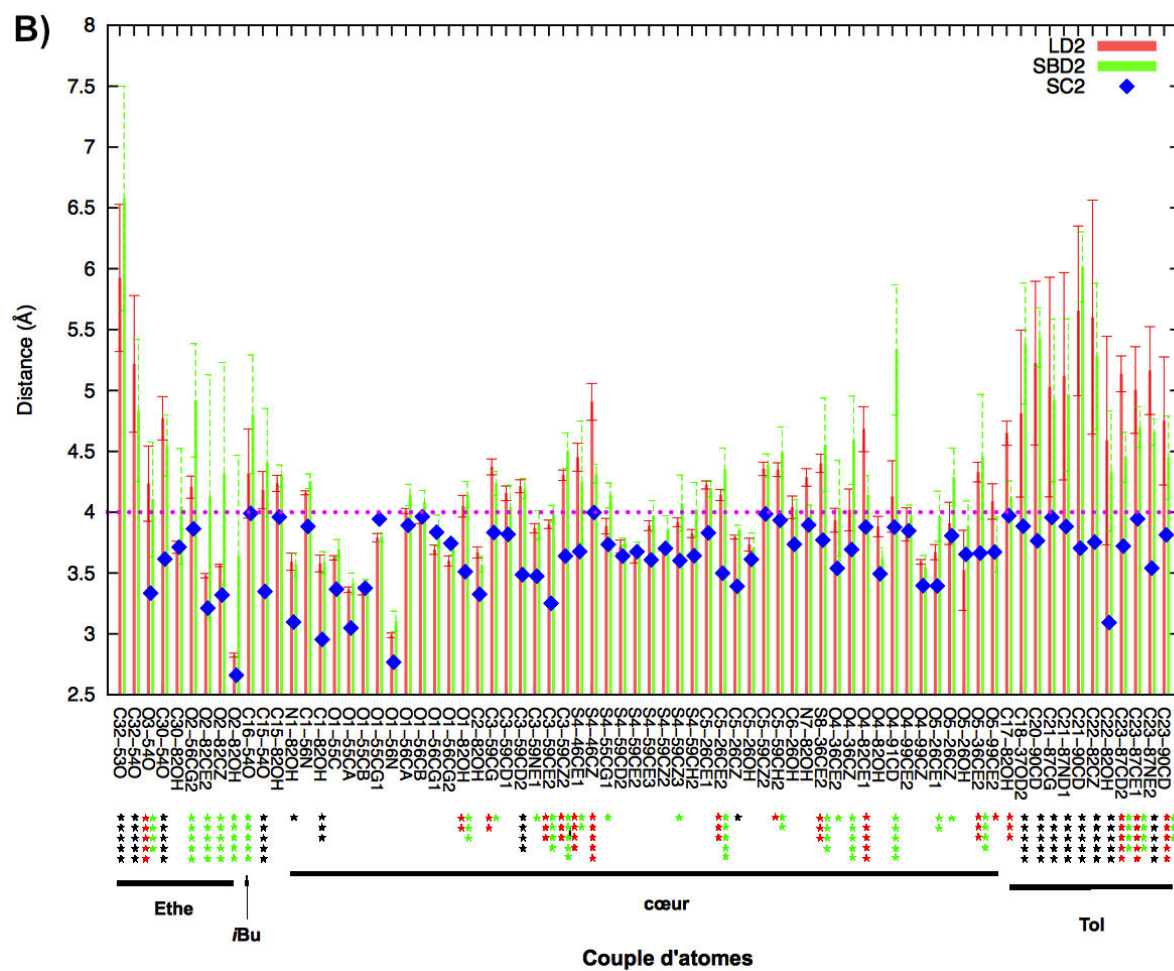
En conclusion de ces analyses, les simulations LD permettent d'obtenir des états complexés stables qui présentent les caractéristiques attendues expérimentalement qui sont également reproduites par les simulations utilisant une représentation plus réaliste du solvant. Les résultats obtenus pour les états complexés valident l'utilisation de la procédure de simulation LD utilisée dans cette étude. Ces résultats montrent également que le type de simulation LD utilisant une solvation implicite peut remplacer un type de simulation utilisant une solvation explicite afin de réduire les temps de calcul des simulations des états complexés^k. Cette méthode a donc été

k. Le fait que des simulations utilisant une solvation implicite puisse remplacer des simulations une représentation explicite du solvant avait déjà été suggéré par Cornell *et al.* dans leur étude de la flexibilité de l'interleukine 8 [107].

utilisée pour la décomplexation du ligand. Ainsi, le protocole de décomplexation, présenté dans le chapitre suivant, a été appliqué sur des structures tirées des simulations LD de chaque état complexé.

FIGURE 4.5 – Listes des valeurs moyennes issues des simulations LD et SBD des 57 et 74 distances de séparation respectivement entre les atomes de FKBP12 et du ligand **8** (A) et entre ceux de FKBP12 et du ligand **308** (B). Ces listes correspondent à tous les couples d'atomes protéine-ligand distants au plus de 4 Å trouvés respectivement dans SC1 et dans SC2. Chaque distance moyenne de séparation qui diffère de sa distance de référence d'une quantité comprise dans la tranche]0,4 ; 0,5],]0,5 ; 0,6],]0,6 ; 0,7],]0,7 ; 0,8],]0,8 ; ∞] Å est respectivement indiquée par une, deux, trois, quatre ou cinq étoiles. Les étoiles rouges et vertes sont respectivement utilisées pour les résultats des simulations LD et SBD tandis que les étoiles noires sont utilisées pour les résultats des deux types de simulation.





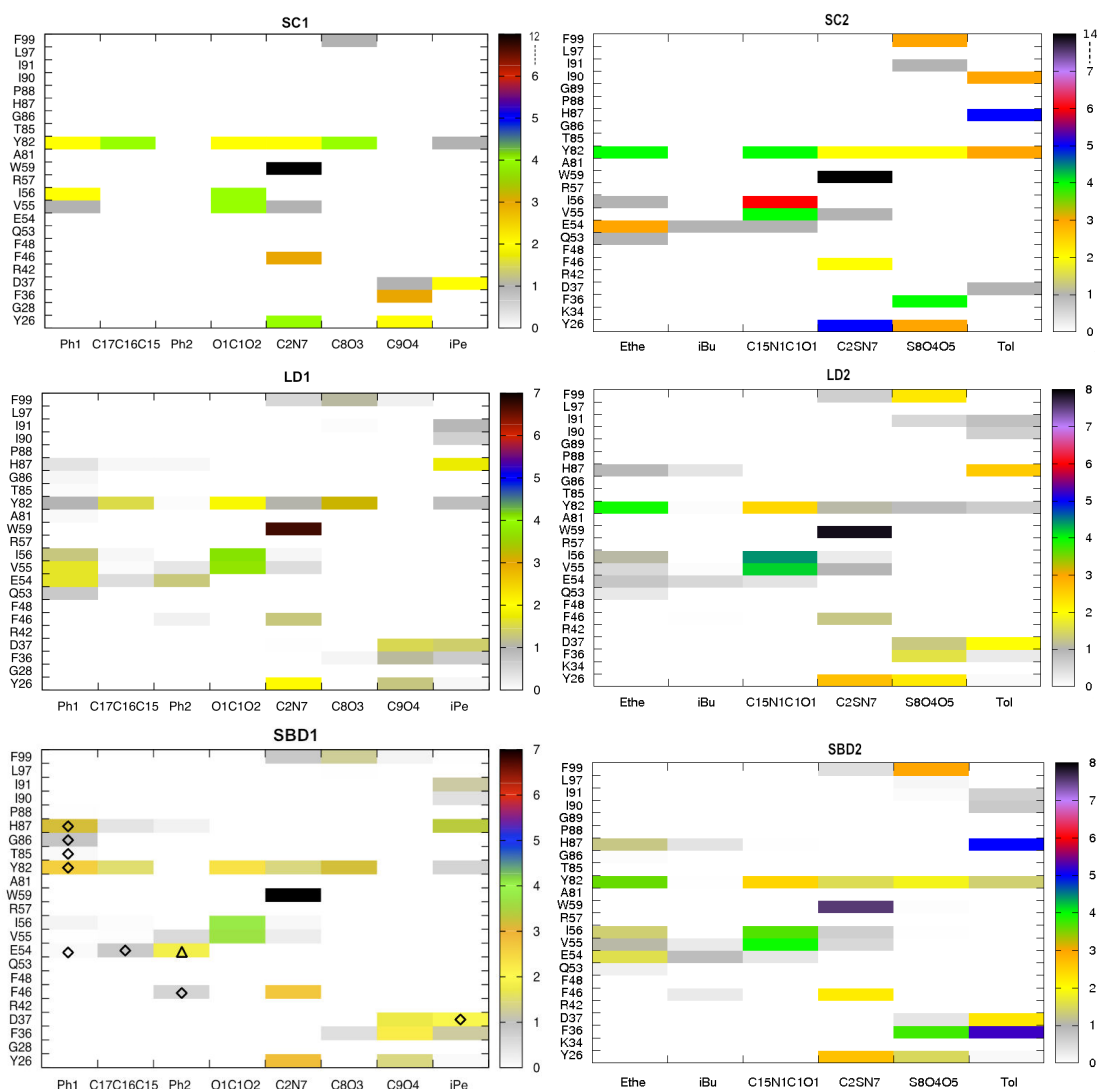


FIGURE 4.6 – Cartes des nombres d’interactions formées entre FKBP12 et le ligand **8** dans SC1 et au cours des simulations LD1 et SBD1 (gauche), et entre FKBP12 et le ligand **8** dans SC2 et au cours des simulations LD2 et SBD2 (droite). Notons la différence d’échelle pour les valeurs les plus élevées dans les structures cristallographiques par rapport aux valeurs issues des simulations. Pour les simulations SBD1 et SBD2, les nombres moyens de molécules d’eau formant des interactions à la fois avec une partie du ligand et avec un résidu de la FKBP12 sont également indiqués par un losange et un triangle pour des valeurs comprises dans les intervalles respectifs $[0,5 ; 1]$ et $]1 ; 1,5]$. Pour les simulations SBD2, il y a absence de molécule d’eau en interaction à la fois avec une partie du ligand et un résidu de FKBP12.

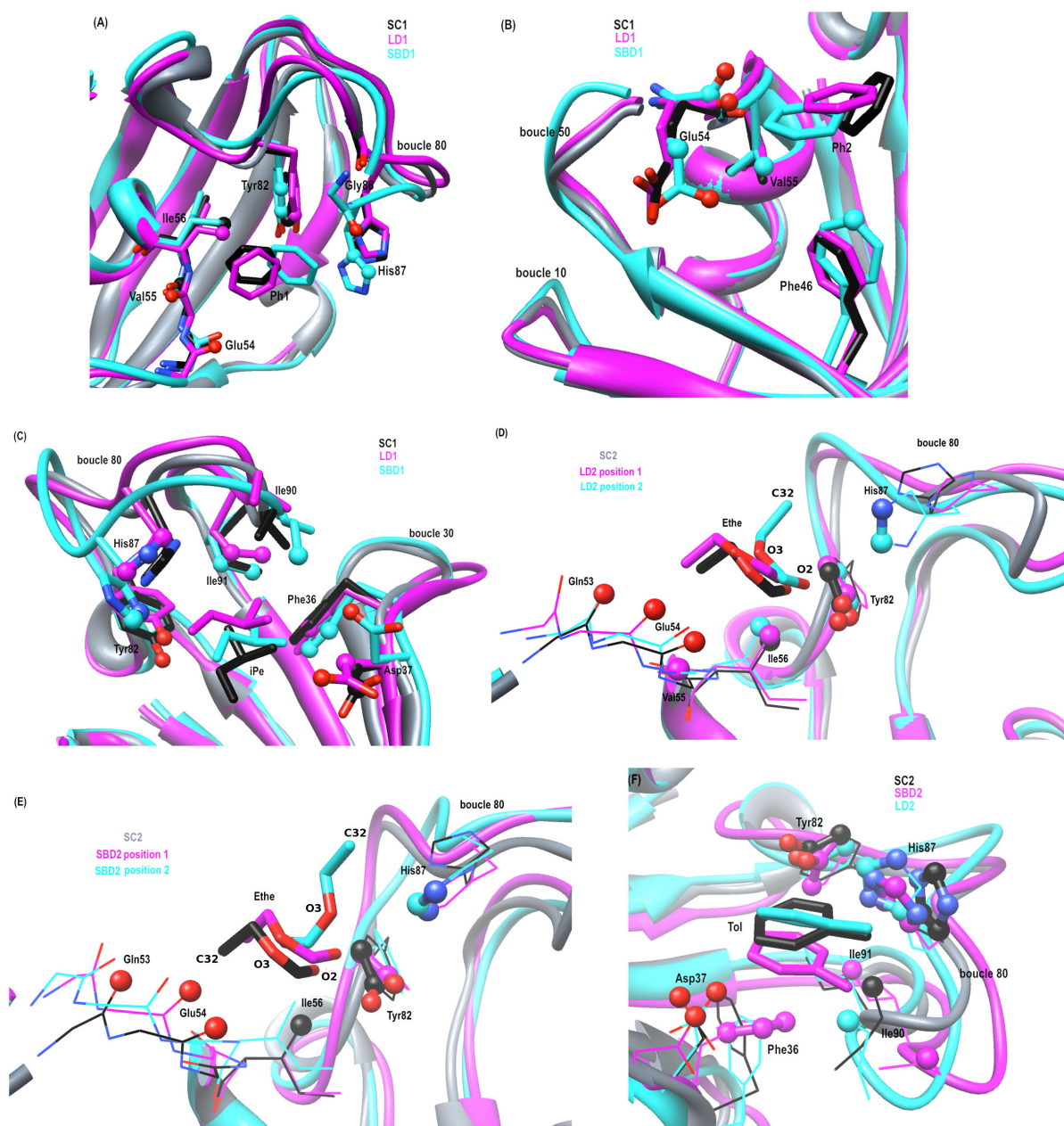


FIGURE 4.7 — Comparaison des positions des parties (A) Ph1 du ligand **8** dans SC1, LD1 et SBD1, (B) Ph2 de **8** dans SC1, LD1 et SBD1, (C) *i*Pe de **8** dans SC1, LD1 et SBD1, (D) Ethe du ligand **308** dans SC2 et LD2, (E) Ethe de **308** dans SC2 et SBD2, et (F) Tol de **308** dans SC2, LD2 et SBD2. Ces images correspondent à des captures instantanées de la position du ligand par rapport au site de fixation de FKBP12 et permettent de représenter les interactions transitoires observées au cours des simulations LD et SBD des deux états complexés. Les atomes de FKBP12 qui sont distants de moins de 4 Å d'un des atomes de la partie du ligand considérée sont représentés sous forme de boule. Pour les captures (D) et (E), les atomes des chaînes latérales des résidus Gln53, Glu54 et Val55 sont cachées afin d'observer plus facilement les interactions transitoires formées par le ligand avec les atomes du squelette de ces résidus.

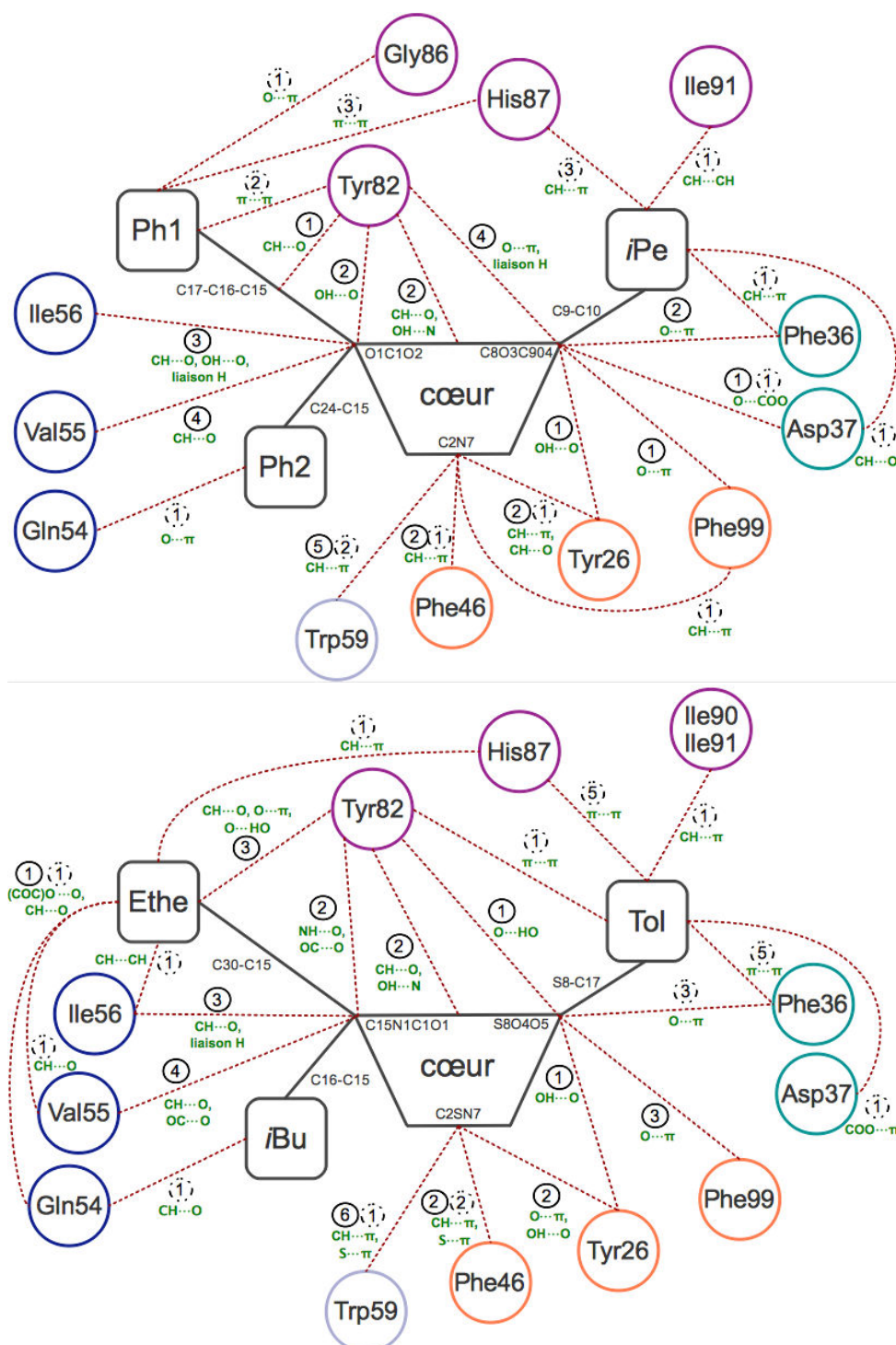


FIGURE 4.8 – Résumé des interactions formées entre FKBP12 et le ligand **8** dans EC1 (haut), et FKBP12 et le ligand **308** dans EC2 (bas). Les interactions formées entre une partie du ligand et un résidu de la protéine sont représentés par des traits en pointillés rouges. Les nombres d'interactions permanentes et d'interactions transitoires sont entourés respectivement par des cercles en trait continu et en pointillés. Les types d'interaction sont indiqués en vert. Le ligand ainsi que les résidus de la protéine sont positionnés de manière similaire à ce qui est observé dans le site de fixation (les résidus qui sont proches dans la structure sont entourés par un cercle de même couleur).

Chapitre 5

Protocole de décomplexation et étude des états intermédiaires

Les processus biochimiques importants, comme la formation ou la dissociation d'un complexe dans des conditions physiologiques, sont associés à des barrières énergétiques relativement élevées et interviennent sur des durées allant de la milliseconde jusqu'à la seconde, voire la minute [56]. L'échelle de temps du processus de décomplexation d'un système protéine-ligand étant inaccessible par les méthodes actuelles de dynamique moléculaire standard pour l'ensemble des atomes du système, un protocole a été développé afin d'expulser les ligands **8** et **308** du site de fixation de FKBP12 (voir figure 5.1). L'utilisation de ce protocole permet d'obtenir des ensembles de structures métastables (ESMs) dont certains sont ensuite désignés états intermédiaires (EIs) selon les critères définis par Olivieri et Gardebien [38] et ci-après exposés (p. 124). Dans la suite, le protocole mis en place est détaillé en justifiant les choix de la méthode d'expulsion du ligand, des paramètres ainsi que des étapes de ce protocole. Ensuite, les états intermédiaires identifiés sont analysés.

1. Simulations de décomplexation et stabilisation des ensembles de structures métastables

Afin d'expulser le ligand au cours de simulations qui doivent être réalisées sur des temps raisonnables (limite fixée à la dizaine de nanosecondes), il est nécessaire d'introduire une force

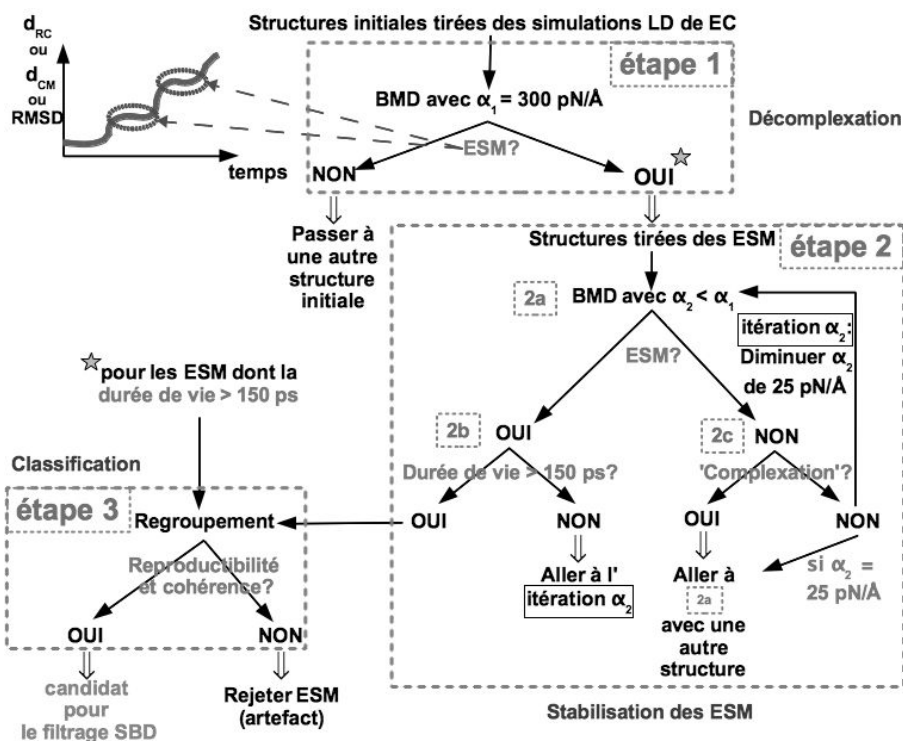


FIGURE 5.1 – Recherche et stabilisation des ensembles de structures métastables observés lors des simulations de décomplexation (BMD) réalisées sur des structures tirées des simulations LD des deux états complexés (structures initiales) puis sélection des candidats pour l'étape de filtrage utilisant des simulations en solvation explicite (SBD). Étape 1 : Simulations de décomplexation à partir des structures tirées des simulations LD de chaque état complexé. L'étoile au dessus de "OUI" indique que les ensembles de structures métastables (ESM) qui présentent des temps de vie supérieurs à 150 ps sont également ajoutés à l'ensemble des ESM classifiés par caractéristique structurale lors de l'étape 3. Étape 2 : dans la sous-étape 2a, pour chaque ESM obtenu lors de l'étape 1, des simulations utilisant la méthode BMD sont réalisées avec une valeur de α_2 inférieure à celle de α_1 afin de stabiliser et d'allonger les temps de vie des ESM. Dans les sous-étapes 2b et 2c, les ESM dont les temps de vie sont supérieurs à 150 ps sont ajoutés à l'ensemble des ESM de l'étape 3 ; dans le cas contraire une valeur de α_2 plus faible est utilisée afin de réaliser de nouvelles simulations de stabilisation. Dans la sous-étape 2c, 'Complexation' correspond à la vérification que l'utilisation d'une force plus faible permet toujours d'éviter le retour du ligand dans le fond du site de fixation de la protéine. Étape 3 : les résultats obtenus pour des ESM possédant des temps de vie supérieurs à 150 ps ont été classifiés par caractéristique structurale commune. Les candidats pour l'étape finale de recherche utilisant des simulations en solvation explicite avec la méthode SBD ont été choisis sur la base de la reproductibilité et de la cohérence entre les données des ESM regroupés dans la même classe.

d'expulsion qui est ajoutée à la fonction d'énergie potentielle moléculaire lors des simulations LD de décomplexation. La force harmonique dépendante du temps implémentée dans la méthode *Biased Molecular Dynamics* (BMD) [37] a été utilisée dans ce but. Bien qu'une représentation explicite du solvant soit généralement plus précise, la relaxation des molécules d'eau est trop longue par rapport aux changements de géométrie du ligand et/ou de la protéine occasionnés par la force introduite. Une représentation implicite du solvant permet donc de s'affranchir de cette limitation [108, 57].

Afin de permettre la séparation de deux partenaires moléculaires, la méthode BMD nécessite la définition d'une coordonnée de réaction (RC). Cette coordonnée de réaction correspond en général à la distance de séparation entre deux atomes, l'un pris dans la protéine, l'autre pris dans le ligand. Dans la méthode BMD, une force quadratique dépendante du temps est introduite dans le système seulement lorsque la valeur de la coordonnée de réaction diminue (voir sous-section 1.2.3. p. 22). Par conséquent, l'évolution sans contrainte des deux partenaires est permise tant que la valeur de la coordonnée de réaction ne diminue pas. De ce fait, parmi les méthodes introduisant une force supplémentaire lors des simulations d'un système moléculaire, la méthode BMD est celle qui introduit le moins de perturbation [109].

À partir de EC1, la force introduite dans le système agit sur une coordonnée de réaction correspondant à la distance séparant les atomes **8**-O1 et C $^{\alpha}$ du résidu Glu5 (d_{RC1}). À partir de EC2, la coordonnée de réaction correspond à la distance de séparation entre les atomes **308**-N7 et C $^{\alpha}$ du résidu Glu5 (d_{RC2}). L'utilisation des atomes **8**-O1 et **308**-N7 comme faisant partie de la coordonnée de réaction a été dictée premièrement par la proximité de la position de ces atomes avec les centres de masse des ligands **8** et **308**. Deuxièmement, les atomes **8**-O1 et **308**-N7 se trouvent dans les parties de cœur des deux ligands qui correspondent aux parties les moins mobiles, d'après les résultats obtenus pour les états complexés (sous-section 4.3 p. 100).

Le deuxième atome du couple choisi pour chaque coordonnée de réaction, l'atome C $^{\alpha}$ du résidu Glu5, a été sélectionné pour trois raisons. Premièrement, le résidu Glu5 se trouve au milieu du brin $\beta 1$ qui est la région de la protéine la moins mobile, d'après l'analyse des états complexés (sous-section 4.3 p. 100). Deuxièmement, le résidu Glu5, le noyau indole de la chaîne latérale du résidu Trp59 (qui forme le fond du site de fixation) et les parties de cœur des ligands sont approximativement alignés dans les états complexés. Cet alignement peut aider initialement à

expulser le ligand selon une direction qui permet d'éviter les collisions avec l'environnement du site de fixation. Troisièmement, l'atome C^α du résidu Glu5 est un des atomes les plus éloignés du centre de masse (CM) du ligand dans chaque état complexé. En utilisant une distance d_{RC} initiale élevée (figure 5.2 (B)), l'échantillonnage par le ligand de la zone de contact S1 conduit, dans la méthode BMD, à l'application d'une force d'expulsion sur le ligand, ce qui n'est pas le cas pour la distance d_{RC} plus faible pour laquelle le ligand explorera la zone S2 plus longuement (figure 5.2 (A)). La valeur initiale de d_{RC} élevée utilisée dans cette étude permet de diminuer la fréquence d'échantillonnage de plusieurs sous-ensembles de l'état complexé comme ceux observé par Huang et Caflisch lors de la décomplexation de petits ligands de faible affinité de FKBP12 [110]. De plus, en utilisant une valeur initiale de d_{RC} élevée, la limite d'application de la force est plus étendue, pour un éloignement équivalent du ligand par rapport à la protéine, que si une valeur initiale de d_{RC} faible est utilisée. Ainsi, la valeur initiale de d_{RC} élevée utilisée ici permet également de diminuer la fréquence d'échantillonnage de plusieurs sous-ensembles d'un état métastable.

Pour les simulations LD de décomplexation par introduction de la force définie dans BMD (étape 1 figure 5.1), plusieurs valeurs de la constante de force d'expulsion (paramètre α) ont été testées à partir de structures extraites des simulations LD de chaque état complexé. Les structures ont été extraites d'une simulation toutes les nanosecondes. Au total, 18 et 57 structures ont été extraites respectivement de EC1 et de EC2^a. Les valeurs initiales testées pour le paramètre α (α_1 de l'étape 1 de la figure 5) vont de 100 à 500 pN/Å par incrément de 100 pN/Å ; les valeurs 50 et 350 pN/Å ont également été testées. Le choix de la valeur initiale α_1 correspond à la recherche d'un compromis entre l'amplitude de la perturbation introduite dans le système et le temps nécessaire pour expulser le ligand.

Les simulations de décomplexation sont analysées en suivant les évolutions temporelles de la distance correspondant à la coordonnée de réaction (d_{RC}), des distances entre les différents centres de masse ci-après définis (d_{CM}) et de différentes valeurs de RMSD de la protéine et du ligand. Les d_{CM} représentent chaque distance entre le centre de masse du site de fixation de FKBP12 et chacun des quatre centres de masse des quatre parties du ligand (Ph1, Ph2, cœur et

^a. Pour les simulations LD2 dont les temps de productions sont inférieurs à 10 ns, les structures du début de la production ont également été extraites.

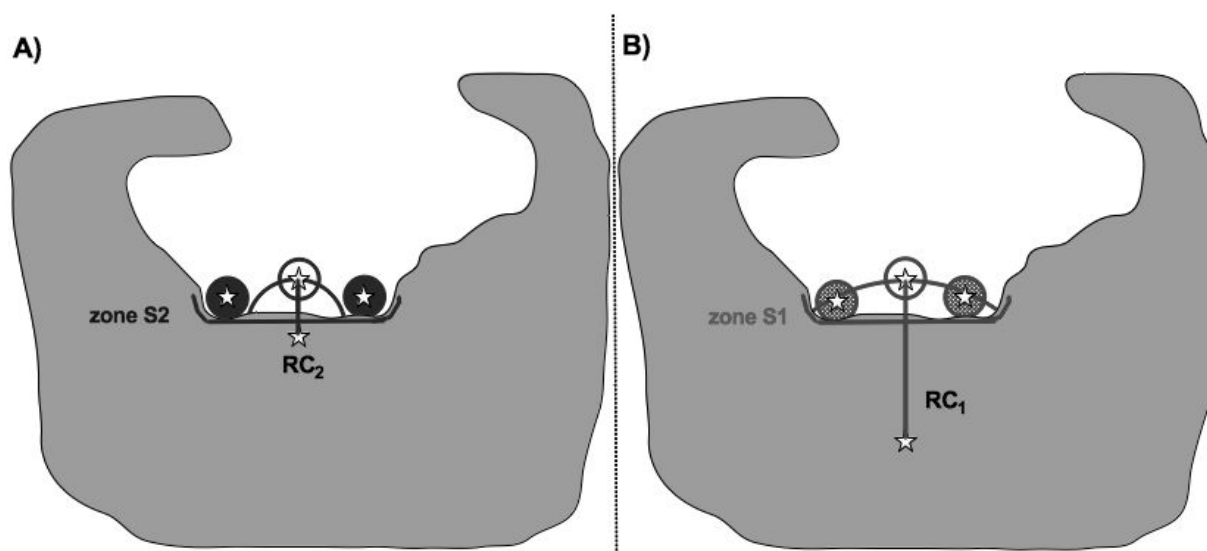


FIGURE 5.2 – Importance de la valeur de la distance séparant les atomes formant le couple de la coordonnée de réaction. Le ligand est représenté par une sphère vide liée à l'atome de la protéine par deux coordonnées de réaction RC_1 et RC_2 . Dans la méthode BMD, dès que $RC < RC_1$ ou $RC < RC_2$ (RC étant la valeur instantanée de la coordonnée de réaction, la force d'expulsion est appliquée à RC ; dès que $RC \geq RC_1$ ou $RC \geq RC_2$, aucune force d'expulsion n'est appliquée, *i.e.* le ligand évolue sans contraintes. L'arc de cercle tracé dans les deux cas représente la limite d'application de la force. À gauche, les sphères pleines correspondent à des positions du ligand pour lesquelles $RC \geq RC_2$. À droite, les sphères hachurées correspondent à des positions pour lesquelles $RC < RC_1$. Les positions des sphères pleines et hachurées sont identiques, montrant que la force d'expulsion est appliquée dans le cas de RC_1 (valeur plus grande) mais pas de RC_2 , alors même que les sphères de droite et de gauche ont des positions équivalentes.

*i*Pe pour le ligand **8** ; Ethe, *i*Bu, cœur et Tol pour le ligand **308**). L'analyse des évolutions des d_{CM} a également été utilisée par Curcio *et al.* dans leur étude de la décomplexation en utilisant la méthode BMD de la fluorescéine et de l'anticorps anti-fluorescéine FITC-E2 [57]. Les RMSD de la protéine et des parties du ligand ont systématiquement été calculés après alignement des atomes C^α de la protéine sur ceux de la structure cristallographique. Pour une simulation donnée, des valeurs présentant de faibles variations autour d'une même moyenne respective pour les distances d_{CM} et d_{RC} , et pour les RMSD durant des périodes d'une centaine de picosecondes sont des indicateurs de la présence d'un ensemble de structures métastables défini comme l'ensemble des structures d'une seule simulation comprises dans l'intervalle [1670 ; 1920 ps] pour la simulation de décomplexation de la figure 5.3 (A) et dans l'intervalle [230 ; 570 ps] pour la simulation de stabilisation de la figure 5.3 (B)^b. Ces simulations de stabilisation sont présentées ci-après et font partie de l'étape 2 du protocole de la figure 5.1.

La valeur α_1 de 300 pN/Å a été choisie pour les simulations de décomplexation de EC1 puisque cette valeur permet d'expulser entièrement le ligand **8** du site de fixation de FKBP12 au cours de productions dont les temps n'excèdent pas 5 ns. Pour les simulations de décomplexation de EC2, la valeur de 300 pN/Å a également été utilisée pour α_1 . Cependant, contrairement aux simulations de décomplexation de EC1, cette valeur ne permet pas d'atteindre la séparation totale de la protéine et du ligand au cours de productions dont les temps n'excèdent pas 10 ns. En revanche, cette valeur permet d'observer des ensembles de structures métastables (ESMs) proches de ceux issus de EI1 (section 2. p. 132). Il est à noter que beaucoup d'ESM ont été obtenus à partir des simulations initiales de décomplexation (utilisant α_1) mais qu'il s'est avéré que la plupart de ces ESM ne correspondent pas à un état intermédiaire puisqu'ils ont été écartés lors de l'étape suivante de stabilisation ou lors de l'étape de classification des ESM (respectivement étapes 2 et 3 figure 5.1). Pour tous les ESM déterminés au cours de l'étape 1 du protocole, des structures ont été tirées de ces ensembles afin de les stabiliser, *i.e.* augmenter le temps de vie de ces états, lors de l'étape 2 de ce protocole.

Au cours de l'étape 2 du protocole, une ou plusieurs structures de chaque ESM déterminé à l'issue de l'étape 1 a été utilisée afin de réaliser des simulations de stabilisation de ces ESM. Ces

^b. Il est important de noter que les valeurs de distance et de RMSD ont été décalées afin d'utiliser la même échelle pour chaque figure.

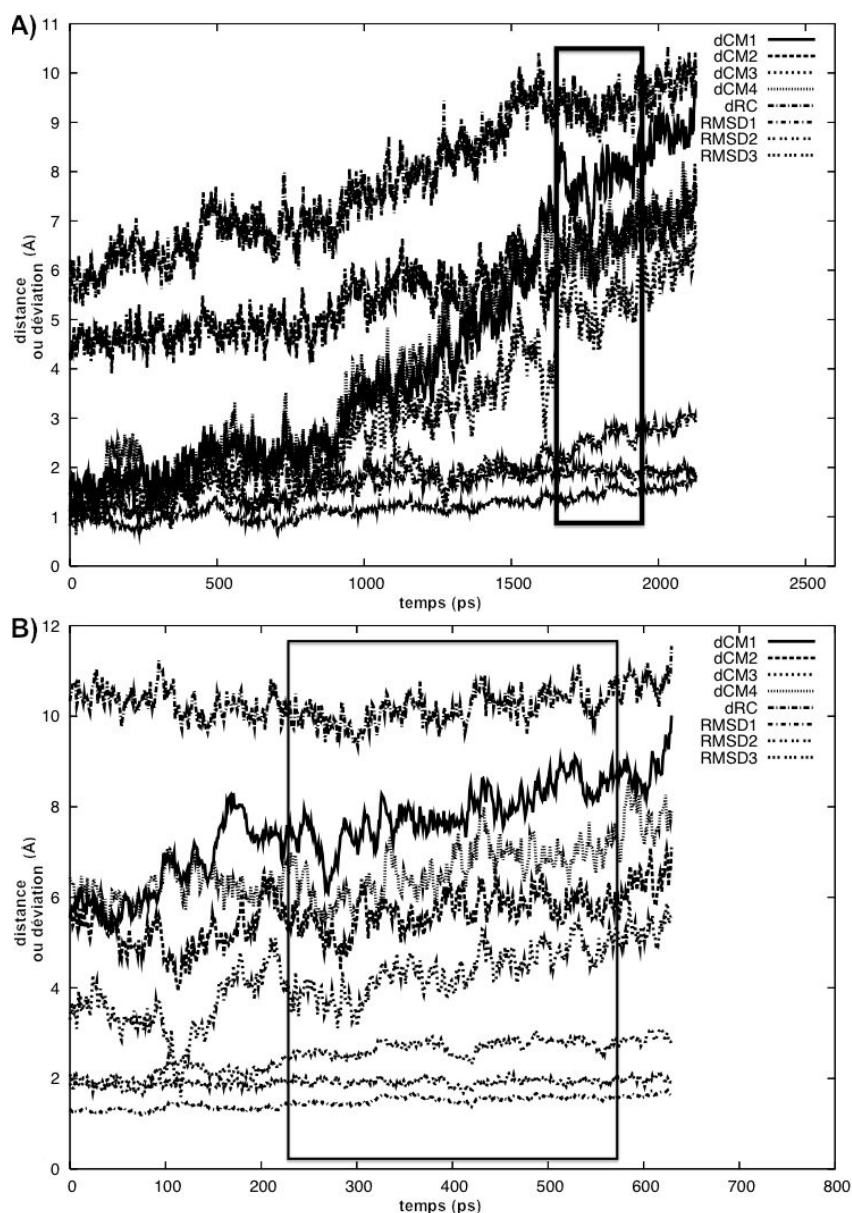


FIGURE 5.3 – Suivi des distances séparant les centres de masse des parties du ligand **308** et du site de fixation de FKBP12 (dCM1-4), les atomes **308**-N1 et Glu5- C^α (d_{RC}) ainsi que des RMSD des atomes C^α de la protéine (RMSD1) et de la boucle 80 (RMSD2 et RMSD3) au cours d’une simulation de décomplexation (A) et d’une simulation de stabilisation de l’ESM tiré de la décomplexation (B). Les dCM1, dCM2, dCM3 et dCM4 correspondent aux distances séparant le centre de masse du site de fixation de FKBP12 et le centre de masse, respectivement, des parties de cœur, Ethe, *i*Bu et Tol de **8**. Les RMSD sont calculés après alignement A1 pour la protéine (RMSD1) et après alignements A2 et A3 (respectivement RMSD2 et RMSD3) pour la boucle 80 (les alignements A1, A2 et A3 sont décrits p. 136). La zone encadrée en noir montre des valeurs dont les variations sont toutes stables durant une période de temps de quelques centaines de picosecondes faisant apparaître la présence d’un ensemble de structures métastables.

simulations de stabilisation emploient des forces d'expulsion plus faibles permettant de stabiliser les ESM. En effet, le ligand ayant commencé à s'éloigner, les interactions intermoléculaires sont moins nombreuses, ce qui conduit à utiliser une force plus faible permettant un équilibre entre expulsion et recomplexation du ligand avec la protéine. Cet équilibre, lorsqu'il est trouvé pour une valeur de α_2 plus faible que α_1 , entraîne une augmentation du temps de vie des ESM et des valeurs plus stables de d_{RC} , d_{CM} et RMSD pour la protéine et le ligand, comme présenté sur la figure 5.3 (B). Pour les ESM dont les temps de vie sont inférieurs à 150 ps et pour les simulations qui ne montrent aucune stabilité des valeurs d_{RC} , d_{CM} et RMSD, une structure en a été extraite pour effectuer des simulations avec une valeur de α diminuée de 25 pN/Å (itération α_2 figure 5.1). Dans les cas où soit la valeur de α_2 est égale à 25 pN/Å, soit le ligand est redescendu dans le fond du site de fixation, une nouvelle structure parmi celles tirées des ESM de l'étape 1 est utilisée afin d'effectuer des simulations de stabilisation d'un autre ESM (étape «aller à 2a» de la figure 5.1). Les ESM dont les temps de vie sont supérieurs à 150 ps sont regroupés, de même que ceux issus de l'étape 1, pour être classifiés à l'étape 3.

Pour les simulations de stabilisation des ESM obtenues à partir du complexe FKBP12-**308**, l'étape 2 du protocole a été légèrement simplifiée. Afin de diminuer le nombre de simulations de stabilisation à effectuer, seule la valeur de α de 250 pN/Å a été utilisée. Cette valeur permet d'obtenir un nombre suffisant d'ESM dont les temps de vie sont supérieurs à 150 ps (voir section 2. p. 132)

L'étape 3 du protocole correspond à la classification des ESM obtenus lors des simulations de décomplexation^c et de stabilisation (étapes 1 et 2 de la figure 5.1), et dont les temps de vie sont supérieurs à 150 ps. Les quatre critères suivants ont été utilisés afin de classer les ESM représentant les mêmes états métastables et de sélectionner, parmi ces états, ceux qui sont susceptibles de correspondre à un état intermédiaire. Premièrement, comme indiqué précédemment, les ESM doivent être stables sur des périodes d'au moins 150 ps. Font partie d'une même classe les ESM pour lesquelles leurs valeurs pour d_{RC} , d_{CM} et RMSD sont proches les unes des autres et relativement constantes. Le même critère de stabilité structurale a été utilisé par Li et

c. Pour le complexe FKBP12-**308**, aucun ESM obtenu à l'issue des simulations de décomplexation (étape 1 du protocole) n'a été pris en compte pour l'étape de classification. Afin d'obtenir des classes encore plus homogènes, seuls les ESM issus des simulations de stabilisation ont été pris en compte.

Daggett dans la recherche d'un état intermédiaire se formant au cours du processus de dénaturation de la barnase [111]. Deuxièmement, la structure de la protéine ne doit pas être trop altérée, hormis celle de la boucle 80 qui est connue pour être flexible et qui contribue au site de fixation de FKBP12 en entourant la cavité principale (figure 4.1 p. 91). Troisièmement, les ESM doivent balayer des conformations dont les structures sont apparentées. En particulier, les positions du ligand à proximité du site de fixation doivent être proches pour les ESM d'une même classe, indiquant une homogénéité pour ces positions. La reproductibilité et l'homogénéité des données pour les ESM sont des indicateurs de la convergence des simulations qui est suffisante pour fournir une vision globale des caractéristiques des états métastables. Quatrièmement, d'après l'hypothèse de l'existence d'un état intermédiaire le long du chemin de complexation, les structures de la protéine et du ligand ainsi que leur orientation relative dans les ESM d'une classe donnée doivent être de sorte qu'une connexion, au moins conceptuelle, avec l'état complexé respectif soit possible.

Parmi les ESM obtenus lors de l'application du protocole sur EC1, quatre classes d'ESM appelées CESM11, CESM12, CESM13 et CESM14 ont pu être identifiées. Quatre classes d'ESM, CESM21, CESM22, CESM23 et CESM24 ont également été identifiées à partir du protocole appliqué sur EC2. Les valeurs de d_{RC} , d_{CM} et RMSD correspondant à chaque ESM de chaque classe sont présentés dans le tableau 5.1 ; les valeurs moyennes et les déviations standards pour chacune des classes sont également présentées. Chaque classe d'ESM est alors définie comme un état métastable identifié au niveau LD.

La dernière étape de la recherche des états intermédiaires consiste à extraire des structures de chacune des classes pour effectuer des simulations SBD. À la suite de ces simulations, si un même état métastable est caractérisé par les deux types de simulation LD et SBD, alors ce dernier critère respecté constitue un indicateur important de la stabilité de cet état qui est ainsi validé comme état intermédiaire.

TABLEAU 5.1 — Classification des ESM observés lors de l'application du protocole pour expulser le ligand **8** (haut) et le ligand **308** (bas) du site de fixation de FKBP12. Les données présentées correspondent aux caractéristiques structurales qui ont été utilisées lors de l'étape de classification du protocole. Les RMSD de la protéine et du ligand ont été calculés après alignement des atomes C α de la protéine sur leurs positions de référence. Pour les RMSD des atomes lourds du ligand, des atomes C α de tous les résidus de FKBP12 et des atomes C α des résidus formant le site de fixation, l'alignement A1 (sous-section 2.1.1. p. 87) a été utilisé. Pour les RMSD des atomes C α de la boucle 80, les alignements A2 et A3 ont été utilisés. Les lignes en gras correspondent à (i) la valeur de référence mesurée dans la structure cristallographique (SC1 et SC2), (ii) aux valeurs moyennes calculées sur les simulations LD de l'état complexé (LD1 et LD2), (iii) aux valeurs moyennes associées à une classe de ESM (CESM11-14 et CESM21-CES24) et (iv) aux valeurs moyennes associées à l'état intermédiaire (EI1 et EI2).

	SC1	d _{CM}					iPe	d _{RC1}
		Ligand 8	Ph1	Ph2	cœur			
		4,75	9,24	7,42	2,21		5,61	20,10
	EC1 LD	5,22 ± 0,05	9,72 ± 0,19	7,88 ± 0,09	2,73 ± 0,03		6,26 ± 0,07	20,36 ± 0,03
ESM11		5,63 ± 0,19	8,37 ± 0,37	9,72 ± 0,31	3,27 ± 0,21	6,71 ± 0,30		21,07 ± 0,24
ESM12		5,65 ± 0,18	8,37 ± 0,33	9,96 ± 0,32	3,20 ± 0,19	6,39 ± 0,30		21,09 ± 0,22
ESM14		5,64 ± 0,16	8,47 ± 0,33	9,82 ± 0,29	3,26 ± 0,20	6,48 ± 0,33		21,16 ± 0,23
ESM15		6,14 ± 0,29	8,57 ± 0,44	10,34 ± 0,48	3,79 ± 0,32	7,05 ± 0,40		22,00 ± 0,35
ESM16		5,97 ± 0,20	9,06 ± 0,27	9,91 ± 0,36	3,74 ± 0,23	7,49 ± 0,32		21,51 ± 0,25
ESM17		5,95 ± 0,27	8,97 ± 0,37	10,05 ± 0,48	3,57 ± 0,27	6,52 ± 0,29		21,88 ± 0,29
CESM11		5,83 ± 0,22	8,63 ± 0,31	9,97 ± 0,21	3,47 ± 0,26	6,78 ± 0,42		21,45 ± 0,41
ESM19		8,91 ± 0,29	11,78 ± 0,41	10,75 ± 0,30	7,46 ± 0,31	11,59 ± 0,36		23,18 ± 0,33
ESM110		9,54 ± 0,26	12,46 ± 0,32	11,17 ± 0,44	8,04 ± 0,36	12,11 ± 0,41		24,18 ± 0,26
ESM111		9,68 ± 0,24	12,54 ± 0,31	10,70 ± 0,33	8,39 ± 0,31	11,93 ± 0,43		24,23 ± 0,35
ESM112		9,96 ± 0,36	12,79 ± 0,40	11,14 ± 0,39	8,53 ± 0,41	12,82 ± 0,45		23,54 ± 0,33
CESM12		9,52 ± 0,44	12,39 ± 0,43	10,94 ± 0,25	8,11 ± 0,48	12,11 ± 0,52		23,78 ± 0,51
ESM113		11,51 ± 0,31	15,49 ± 0,55	12,18 ± 0,42	10,95 ± 0,37	11,34 ± 0,59		27,18 ± 0,33
ESM114		11,60 ± 0,34	15,52 ± 0,58	12,64 ± 0,55	10,90 ± 0,49	11,58 ± 0,85		27,22 ± 0,43
ESM115		11,57 ± 0,30	15,67 ± 0,48	12,16 ± 0,40	10,75 ± 0,39	11,92 ± 0,62		27,14 ± 0,39
CESM13		11,56 ± 0,05	15,56 ± 0,09	12,33 ± 0,27	10,86 ± 0,10	11,61 ± 0,29		27,18 ± 0,04
ESM116		13,17 ± 0,26	17,38 ± 0,28	12,70 ± 0,43	12,63 ± 0,29	11,81 ± 0,75		27,94 ± 0,29
ESM117		13,68 ± 0,56	17,97 ± 0,59	12,71 ± 0,71	13,46 ± 0,53	11,88 ± 0,88		28,27 ± 0,49
ESM118		13,44 ± 0,32	17,80 ± 0,34	12,60 ± 0,41	13,33 ± 0,38	10,89 ± 0,51		28,94 ± 0,29
CESM14		13,43 ± 0,25	17,71 ± 0,30	12,67 ± 0,06	13,14 ± 0,45	11,53 ± 0,55		28,38 ± 0,51
EI1		8,84 ± 0,13	11,56 ± 0,28	11,20 ± 0,15	7,10 ± 0,12	11,24 ± 0,09		23,47 ± 0,12

RMSD atomes lourds (A1)						RMSD C α			
ligand	308	Ph1	Ph2	cœur	iPe	Protéine (A1)	site de fixation (A1)	boucle 80 (A2)	boucle 80 (A3)
EC1	LD	1,90 \pm 0,16	2,78 \pm 0,27	1,93 \pm 0,22	1,08 \pm 0,06	2,15 \pm 0,79	0,68 \pm 0,09	1,60 \pm 0,25	0,98 \pm 0,34
ESM11		1,93 \pm 0,21	2,23 \pm 0,62	2,15 \pm 0,50	1,59 \pm 0,28	2,07 \pm 0,44	0,76 \pm 0,07	1,12 \pm 0,26	0,67 \pm 0,19
ESM12		1,88 \pm 0,28	2,61 \pm 0,76	2,35 \pm 0,41	1,27 \pm 0,25	1,56 \pm 0,36	0,76 \pm 0,05	0,89 \pm 0,17	0,56 \pm 0,11
ESM14		1,97 \pm 0,24	2,55 \pm 0,67	2,24 \pm 0,36	1,52 \pm 0,26	1,89 \pm 0,50	0,93 \pm 0,06	1,83 \pm 0,19	1,25 \pm 0,11
ESM15		2,75 \pm 0,41	4,02 \pm 0,86	2,51 \pm 0,45	2,22 \pm 0,39	2,34 \pm 0,39	0,95 \pm 0,07	2,15 \pm 0,23	1,67 \pm 0,12
ESM16		2,31 \pm 0,25	1,65 \pm 0,36	2,84 \pm 0,57	2,23 \pm 0,29	2,81 \pm 0,30	0,85 \pm 0,04	1,71 \pm 0,11	1,20 \pm 0,08
ESM17		2,41 \pm 0,27	2,57 \pm 0,78	2,51 \pm 0,43	1,85 \pm 0,31	3,38 \pm 0,13	0,92 \pm 0,07	0,90 \pm 0,18	0,61 \pm 0,13
CESM11		2,21 \pm 0,34	2,60 \pm 0,78	2,43 \pm 0,25	1,78 \pm 0,39	2,34 \pm 0,66	0,86 \pm 0,09	1,43 \pm 0,53	0,99 \pm 0,45
ESM19		6,59 \pm 0,37	4,47 \pm 0,37	7,74 \pm 0,58	6,23 \pm 0,36	8,84 \pm 0,53	1,50 \pm 0,06	3,40 \pm 0,17	2,16 \pm 0,11
ESM110		6,98 \pm 0,38	4,38 \pm 0,48	8,25 \pm 0,56	6,69 \pm 0,40	9,29 \pm 0,58	1,45 \pm 0,06	3,61 \pm 0,20	2,03 \pm 0,11
ESM111		6,78 \pm 0,30	3,84 \pm 0,46	8,22 \pm 0,54	6,69 \pm 0,31	8,53 \pm 0,50	1,73 \pm 0,09	4,51 \pm 0,31	2,12 \pm 0,26
ESM112		7,56 \pm 0,46	4,70 \pm 0,47	8,83 \pm 0,66	7,23 \pm 0,44	10,31 \pm 0,67	1,64 \pm 0,06	4,17 \pm 0,22	1,78 \pm 0,12
CESM12		6,98 \pm 0,42	4,35 \pm 0,36	8,26 \pm 0,44	6,71 \pm 0,41	9,24 \pm 0,78	1,58 \pm 0,13	3,92 \pm 0,51	2,02 \pm 0,17
ESM113		8,96 \pm 0,31	4,17 \pm 0,40	10,56 \pm 0,51	9,49 \pm 0,38	10,74 \pm 0,46	2,08 \pm 0,08	5,96 \pm 0,28	2,12 \pm 0,10
ESM114		8,77 \pm 0,40	4,22 \pm 0,54	10,09 \pm 0,66	9,29 \pm 0,51	10,71 \pm 0,79	2,09 \pm 0,07	5,97 \pm 0,21	2,09 \pm 0,11
ESM115		8,85 \pm 0,35	3,92 \pm 0,54	10,25 \pm 0,50	9,21 \pm 0,42	11,25 \pm 0,58	2,05 \pm 0,09	5,82 \pm 0,29	2,13 \pm 0,11
CESM13		8,86 \pm 0,09	4,10 \pm 0,16	10,30 \pm 0,24	9,33 \pm 0,15	10,90 \pm 0,31	2,07 \pm 0,02	5,92 \pm 0,08	2,11 \pm 0,02
ESM116		10,65 \pm 0,34	6,32 \pm 0,52	12,87 \pm 0,42	11,59 \pm 0,33	10,55 \pm 0,88	2,07 \pm 0,06	5,62 \pm 0,18	1,86 \pm 0,10
ESM117		10,91 \pm 0,65	5,58 \pm 0,68	13,34 \pm 0,97	12,14 \pm 0,63	10,28 \pm 0,88	1,98 \pm 0,11	5,35 \pm 0,30	2,14 \pm 0,16
ESM118		10,40 \pm 0,34	5,39 \pm 0,50	12,32 \pm 0,45	11,88 \pm 0,41	9,26 \pm 0,55	1,93 \pm 0,05	5,40 \pm 0,17	1,95 \pm 0,10
CESM14		10,65 \pm 0,26	5,76 \pm 0,49	12,84 \pm 0,51	11,87 \pm 0,27	10,03 \pm 0,68	1,99 \pm 0,07	5,46 \pm 0,14	1,98 \pm 0,14
E11		6,24 \pm 0,15	4,15 \pm 0,19	7,06 \pm 0,20	5,98 \pm 0,16	8,53 \pm 0,19	1,39 \pm 0,04	3,46 \pm 0,11	2,14 \pm 0,09

	ligand	d_{CM}					d_{RC2}
		8	Ethe	<i>i</i> Bu	cœur	Tol	
SC2	3,24	6,07					
EC2 LD	3,77 ± 0,07	6,52 ± 0,11	5,16 ± 0,22	1,59 ± 0,09	5,04 ± 0,10	18,93 ± 0,08	
ESM22	6,65 ± 0,34	7,99 ± 0,46	8,67 ± 0,42	4,97 ± 0,30	7,69 ± 0,51	23,24 ± 0,30	
ESM216	6,60 ± 0,34	7,17 ± 0,45	7,79 ± 0,67	5,34 ± 0,45	8,46 ± 0,51	22,96 ± 0,36	
ESM221	6,39 ± 0,35	7,77 ± 0,46	8,21 ± 0,43	4,54 ± 0,40	7,80 ± 0,60	23,28 ± 0,39	
ESM222	7,18 ± 0,35	9,17 ± 0,42	8,66 ± 0,49	4,57 ± 0,45	8,60 ± 0,30	23,37 ± 0,30	
ESM224	6,28 ± 0,41	7,20 ± 0,46	8,05 ± 0,50	4,44 ± 0,61	8,03 ± 0,29	23,21 ± 0,37	
ESM228	7,04 ± 0,30	8,21 ± 0,51	8,82 ± 0,31	4,64 ± 0,29	8,98 ± 0,32	23,93 ± 0,32	
ESM232	6,40 ± 0,31	7,20 ± 0,43	7,92 ± 0,50	5,13 ± 0,28	8,22 ± 0,35	23,72 ± 0,39	
CEM216	6,65 ± 0,34	7,82 ± 0,73	8,30 ± 0,41	4,80 ± 0,35	8,25 ± 0,46	23,39 ± 0,33	
ESM21	7,50 ± 0,26	7,95 ± 0,32	9,36 ± 0,32	6,04 ± 0,37	8,73 ± 0,36	24,00 ± 0,31	
ESM27	7,45 ± 0,24	8,47 ± 0,37	9,48 ± 0,28	5,73 ± 0,27	8,41 ± 0,45	24,28 ± 0,26	
ESM212	7,49 ± 0,34	8,47 ± 0,45	9,38 ± 0,41	5,77 ± 0,31	8,50 ± 0,37	24,40 ± 0,37	
ESM215	7,87 ± 0,30	7,99 ± 0,37	9,31 ± 0,34	5,86 ± 0,43	10,19 ± 0,40	24,20 ± 0,41	
ESM217	7,80 ± 0,40	7,53 ± 0,45	8,91 ± 0,78	7,26 ± 0,51	9,29 ± 0,66	24,22 ± 0,36	
ESM218	7,19 ± 0,48	7,75 ± 0,65	8,77 ± 0,81	5,84 ± 0,43	8,61 ± 0,52	23,82 ± 0,54	
ESM220	7,64 ± 0,54	8,25 ± 0,46	9,30 ± 0,44	5,83 ± 0,47	9,22 ± 0,97	23,93 ± 0,41	
ESM225	7,58 ± 0,30	8,32 ± 0,60	9,05 ± 0,38	5,53 ± 0,26	9,55 ± 0,35	24,16 ± 0,34	
ESM229	7,34 ± 0,39	7,75 ± 0,39	8,99 ± 0,34	5,22 ± 0,45	9,56 ± 0,55	24,32 ± 0,34	
ESM230	8,14 ± 0,32	8,11 ± 0,48	9,65 ± 0,33	6,22 ± 0,42	10,49 ± 0,45	25,12 ± 0,35	
ESM233	7,87 ± 0,28	8,99 ± 0,50	9,74 ± 0,32	6,12 ± 0,32	9,26 ± 0,38	24,64 ± 0,33	
CEM227	6,3 ± 0,27	8,14 ± 0,41	9,27 ± 0,30	5,95 ± 0,52	9,25 ± 0,68	24,28 ± 0,36	
ESM23	8,21 ± 0,22	8,42 ± 0,28	10,24 ± 0,28	6,10 ± 0,37	10,18 ± 0,30	24,71 ± 0,33	
ESM28	8,18 ± 0,24	8,75 ± 0,49	10,08 ± 0,38	6,74 ± 0,31	8,96 ± 0,35	25,20 ± 0,43	
ESM227	8,10 ± 0,33	8,44 ± 0,39	9,47 ± 0,34	6,19 ± 0,44	10,22 ± 0,47	24,16 ± 0,35	
CEM238	16 ± 0,05	8,54 ± 0,18	9,93 ± 0,41	6,34 ± 0,35	9,78 ± 0,72	24,69 ± 0,52	
ESM24	9,34 ± 0,28	8,87 ± 0,41	10,34 ± 0,47	8,27 ± 0,42	11,52 ± 0,48	24,16 ± 0,42	
ESM26	8,96 ± 0,47	8,69 ± 0,38	10,36 ± 0,51	7,86 ± 0,58	10,61 ± 0,53	24,16 ± 0,34	
ESM210	9,28 ± 0,30	8,96 ± 0,41	10,36 ± 0,38	8,25 ± 0,35	11,14 ± 0,46	24,24 ± 0,37	
ESM219	8,80 ± 0,26	9,13 ± 0,37	10,33 ± 0,33	7,61 ± 0,32	10,19 ± 0,40	23,95 ± 0,36	
ESM226	8,98 ± 0,29	8,34 ± 0,35	10,06 ± 0,37	8,18 ± 0,39	10,98 ± 0,46	24,48 ± 0,36	
ESM231	9,60 ± 0,46	9,09 ± 0,59	10,43 ± 0,59	8,79 ± 0,48	11,74 ± 0,73	24,51 ± 0,37	
CEM249	16 ± 0,30	8,85 ± 0,30	10,32 ± 0,13	8,16 ± 0,40	11,03 ± 0,57	24,25 ± 0,21	
EI2	7,47 ± 0,17	8,71 ± 0,31	9,28 ± 0,19	5,15 ± 0,14	8,88 ± 0,27	23,54 ± 0,18	

Ligand	RMSD atomes lourds (A1)					RMSD C α				
	308	Ethe	iBu	cœur	Tol	Protéine (A1)	site de fixation (A1)	boucle 80 (A2)	boucle 80 (A3)	
EC2	LD1	5,9 ± 0,12	1,77 ± 0,30	2,24 ± 0,39	1,01 ± 0,04	1,53 ± 0,46	0,98 ± 0,04	0,78 ± 0,03	1,73 ± 0,08	1,11 ± 0,22
ESM22	5,47 ± 0,41	3,01 ± 0,55	5,72 ± 0,70	5,46 ± 0,36	6,76 ± 0,63	1,60 ± 0,06	2,19 ± 0,10	3,46 ± 0,22	1,97 ± 0,09	
ESM216	5,64 ± 0,34	2,17 ± 0,43	4,69 ± 0,69	6,04 ± 0,45	7,19 ± 0,54	1,50 ± 0,08	1,69 ± 0,11	3,13 ± 0,28	2,27 ± 0,11	
ESM221	5,22 ± 0,32	2,85 ± 0,39	5,25 ± 0,44	5,09 ± 0,38	6,70 ± 0,55	1,44 ± 0,06	1,78 ± 0,14	2,72 ± 0,19	1,88 ± 0,14	
ESM222	5,47 ± 0,42	4,06 ± 0,48	5,67 ± 0,67	5,20 ± 0,41	6,68 ± 0,52	1,33 ± 0,05	1,56 ± 0,13	2,20 ± 0,18	1,68 ± 0,11	
ESM224	5,08 ± 0,79	2,74 ± 0,84	5,57 ± 1,25	4,94 ± 0,69	6,33 ± 0,91	1,45 ± 0,14	1,98 ± 0,17	3,37 ± 0,41	2,28 ± 0,08	
ESM228	5,47 ± 0,32	3,44 ± 0,44	6,22 ± 0,45	5,22 ± 0,30	6,61 ± 0,61	1,15 ± 0,05	1,70 ± 0,10	2,26 ± 0,20	1,64 ± 0,13	
ESM232	5,29 ± 0,32	1,96 ± 0,38	4,61 ± 0,53	5,72 ± 0,34	6,59 ± 0,48	1,40 ± 0,05	1,65 ± 0,09	3,37 ± 0,15	2,17 ± 0,17	
CESM215	3,8 ± 0,19	2,89 ± 0,72	5,39 ± 0,58	5,38 ± 0,39	6,69 ± 0,26	1,41 ± 0,14	1,79 ± 0,22	2,93 ± 0,54	1,98 ± 0,27	
ESM21	6,84 ± 0,32	3,48 ± 0,24	7,36 ± 0,41	6,92 ± 0,40	8,32 ± 0,42	1,49 ± 0,07	2,17 ± 0,13	3,31 ± 0,25	2,03 ± 0,10	
ESM27	6,47 ± 0,27	3,71 ± 0,29	6,95 ± 0,39	6,43 ± 0,30	7,86 ± 0,49	1,61 ± 0,04	2,31 ± 0,09	3,68 ± 0,21	2,03 ± 0,10	
ESM212	6,28 ± 0,36	3,32 ± 0,52	6,37 ± 0,65	6,36 ± 0,33	7,75 ± 0,50	1,63 ± 0,07	2,26 ± 0,15	3,91 ± 0,20	2,05 ± 0,12	
ESM215	6,32 ± 0,33	2,82 ± 0,33	6,33 ± 0,42	6,37 ± 0,44	8,05 ± 0,44	1,47 ± 0,05	2,00 ± 0,11	3,20 ± 0,18	2,01 ± 0,12	
ESM217	7,08 ± 0,42	2,65 ± 0,41	6,21 ± 0,86	7,89 ± 0,61	8,45 ± 0,74	1,60 ± 0,07	1,92 ± 0,11	3,19 ± 0,14	2,28 ± 0,09	
ESM218	6,15 ± 0,40	2,67 ± 0,60	5,67 ± 0,85	6,54 ± 0,43	7,60 ± 0,61	1,52 ± 0,06	1,87 ± 0,13	3,37 ± 0,24	2,31 ± 0,10	
ESM220	6,87 ± 0,80	3,61 ± 0,82	6,98 ± 1,07	6,75 ± 0,55	8,78 ± 1,22	1,50 ± 0,08	2,08 ± 0,14	3,30 ± 0,20	2,07 ± 0,13	
ESM225	6,34 ± 0,30	3,48 ± 0,56	6,28 ± 0,46	6,10 ± 0,32	8,28 ± 0,42	1,41 ± 0,06	2,09 ± 0,09	3,02 ± 0,27	1,83 ± 0,11	
ESM229	5,71 ± 0,51	2,85 ± 0,39	6,01 ± 0,56	5,65 ± 0,54	7,17 ± 0,71	1,22 ± 0,05	1,72 ± 0,10	2,64 ± 0,13	1,66 ± 0,09	
ESM230	6,47 ± 0,39	3,15 ± 0,39	6,60 ± 0,39	6,57 ± 0,45	8,02 ± 0,72	1,26 ± 0,07	1,88 ± 0,11	2,83 ± 0,27	1,70 ± 0,11	
ESM233	6,39 ± 0,27	3,76 ± 0,37	6,47 ± 0,37	6,36 ± 0,32	7,90 ± 0,44	1,72 ± 0,09	2,31 ± 0,12	3,99 ± 0,33	2,13 ± 0,09	
CESM226	4,5 ± 0,38	3,23 ± 0,42	6,47 ± 0,48	6,54 ± 0,56	8,02 ± 0,44	1,49 ± 0,15	2,06 ± 0,20	3,31 ± 0,42	2,01 ± 0,21	
ESM23	7,50 ± 0,36	4,16 ± 0,29	8,91 ± 0,38	6,97 ± 0,43	9,36 ± 0,51	1,41 ± 0,08	2,24 ± 0,14	3,32 ± 0,23	1,86 ± 0,14	
ESM28	7,15 ± 0,26	3,83 ± 0,50	7,59 ± 0,51	7,41 ± 0,32	8,38 ± 0,35	1,65 ± 0,06	2,36 ± 0,11	3,96 ± 0,16	2,02 ± 0,09	
ESM227	7,50 ± 0,33	4,30 ± 0,30	7,98 ± 0,34	7,06 ± 0,45	9,70 ± 0,52	1,51 ± 0,09	2,21 ± 0,13	3,52 ± 0,24	1,79 ± 0,12	
CESM237	3,8 ± 0,20	4,10 ± 0,24	8,16 ± 0,68	7,15 ± 0,23	9,15 ± 0,68	1,52 ± 0,12	2,27 ± 0,08	3,60 ± 0,33	1,89 ± 0,12	
ESM24	9,69 ± 0,35	5,85 ± 0,34	10,29 ± 0,51	9,41 ± 0,41	12,07 ± 0,81	1,53 ± 0,10	2,34 ± 0,20	3,81 ± 0,32	1,80 ± 0,11	
ESM26	9,16 ± 0,64	5,34 ± 0,48	9,95 ± 0,71	9,03 ± 0,67	11,19 ± 0,84	1,53 ± 0,07	2,27 ± 0,18	3,21 ± 0,22	1,81 ± 0,09	
ESM210	9,10 ± 0,26	5,34 ± 0,36	9,47 ± 0,37	9,16 ± 0,36	11,05 ± 0,62	1,32 ± 0,07	1,60 ± 0,15	2,94 ± 0,22	1,90 ± 0,13	
ESM219	8,55 ± 0,27	5,29 ± 0,39	9,32 ± 0,39	8,53 ± 0,32	10,16 ± 0,53	1,57 ± 0,08	2,36 ± 0,10	3,61 ± 0,18	1,80 ± 0,10	
ESM226	9,19 ± 0,39	5,09 ± 0,51	9,67 ± 0,47	9,26 ± 0,45	11,23 ± 0,62	1,42 ± 0,08	1,94 ± 0,16	3,16 ± 0,30	1,85 ± 0,10	
ESM231	9,99 ± 0,55	5,91 ± 0,51	10,31 ± 0,79	10,02 ± 0,52	12,21 ± 1,07	1,61 ± 0,06	2,32 ± 0,17	3,62 ± 0,23	1,74 ± 0,12	
CESM249	2,8 ± 0,50	5,47 ± 0,33	9,84 ± 0,42	9,24 ± 0,49	11,32 ± 0,75	1,50 ± 0,11	2,14 ± 0,31	3,39 ± 0,34	1,82 ± 0,05	
EI2	6,62 ± 0,24	4,57 ± 0,32	7,61 ± 0,28	5,96 ± 0,17	8,30 ± 0,38	1,63 ± 0,07	2,48 ± 0,11	4,01 ± 0,28	2,00 ± 0,05	

2. Les simulations SBD comme dernière étape de la recherche des états intermédiaires

Afin de déterminer parmi les classes d'ESM candidates celles qui peuvent correspondre à des états intermédiaires, des simulations utilisant une représentation explicite du solvant ont été utilisées. L'utilisation d'une représentation explicite du solvant permet (i) de confirmer ou pas la stabilité des classes d'ESM identifiées précédemment et (ii) d'affiner les états intermédiaires identifiés au niveau LD puisqu'un modèle de solvation explicite fournit une représentation plus réaliste du système. Le type de simulation SBD a été choisi afin d'introduire uniquement un nombre de molécules d'eau dans le système qui soit suffisant pour représenter les évolutions du ligand et du site de fixation de FKBP12. De plus ce type de simulation permet d'utiliser une représentation explicite du solvant équivalente à celle utilisée pour les états complexés. Pour ces simulations SBD, une ou plusieurs structures tirées de chaque classe d'ESM candidate ont été sélectionnées. Des molécules d'eau ont été ajoutées à chacune des structures sélectionnées afin de former une sphère d'eau de 22 Å de diamètre centrée sur le site de complexation. Pour chaque structure solvatée, plusieurs simulations indépendantes ont ensuite été conduites sans appliquer de force d'expulsion ni de contraintes NOE sur le système.

Cette étape essentielle qui consiste à tester la stabilité des classes d'ESM dans une représentation explicite du solvant a permis d'écarter trois des quatre classes candidates pour EI1 et deux des quatre classes candidates pour EI2. Pour le complexe FKBP12-**8**, les classes CESM11, CESM13 et CESM14 ne correspondent pas à des états intermédiaires d'après les résultats des simulations SBD réalisées à partir de structures tirées de ces classes. Pour la classe CESM11, dans l'étape de préparation des simulations SBD, où il s'agit d'ajouter des molécules d'eau à la structure tirée de cette classe, aucune molécule ne peut s'insérer entre le ligand **8** et FKBP12. Or, lors des simulations SBD, l'absence de molécule d'eau séparant le ligand et la protéine conduit à un enfoncement du ligand dans le site de fixation en raison, notamment, des collisions dues aux molécules d'eau. Ainsi, lors des simulations SBD, la classe CESM11 est convertie en un état très proche de EC1^d. Ce résultat important indique la nécessité de la présence d'au

^d. D'ailleurs, sur le tableau 5.1, les valeurs obtenues pour la classe CESM11 sont très proches de celles obtenues pour les simulations LD1, sauf pour la distance entre le centre de masse du site de fixation et le centre de masse de

moins une couche d'eau entre les deux partenaires afin d'obtenir un état intermédiaire stable. L'importance de cette couche d'eau entre les deux partenaires a été suggérée par Shan *et al.* lors de leur étude de la formation des complexes Src-PP1 et dasatinib-PP1 [112]. Pour les classes CESM13 et CESM14, les interactions formées entre FKBP12 et **8** sont peu nombreuses. Toutefois, lors des simulations SBD à partir des structures tirées de ces deux classes, quelques ESM ont été obtenus. En revanche, lors de la tentative de regroupement dans une même classe de ces ESM obtenus en SBD, aucune classe d'ESM présentant des résultats homogènes entre-eux n'a pu être identifiée. De plus, les ESM identifiés lors des simulations SBD ne présentent pas de similitudes avec les ESM des classes respectives CESM13 et CESM14 (obtenues en LD). Les ESM issus des simulations SBD ne satisfont donc pas le premier critère défini précédemment pour l'identification de classes homogènes. La reproductibilité et l'homogénéité des résultats ne pouvant être obtenues à partir des structures issues des CESM13 et CESM14, aucun état intermédiaire n'a pu être obtenu dans ces cas. Pour le complexe FKBP12-**8**, seul un état intermédiaire a été stabilisé en utilisant des simulations SBD à partir d'une structure tirée de la classe CESM12. Pour cet état intermédiaire, appelé par la suite EI1, sept simulations SBD indépendantes ont été obtenues pour une production totale de 12 ns. Cet état intermédiaire est représenté en comparaison avec SC1 sur la figure 5.4 (a).

Pour le complexe FKBP12-**308**, les classes CESM21 et CESM23 n'ont pas été choisies pour les simulations SBD sur la base des analyses préliminaires sur les structures tirées de ces classes après introduction des molécules d'eau dans le système. Pour les structures tirées de CESM21, aucune molécule n'a pu être insérée entre le ligand **308** et FKBP12. Comme précédemment pour la classe CESM11, l'absence de molécules d'eau entre les deux partenaires peut conduire à un enfoncement du ligand dans le site de fixation. La classe CESM21 a donc été abandonnée car ces structures n'auraient pu conduire à l'état intermédiaire recherché. Pour la classe CESM23, malgré la valeur de RMSD pour le site de fixation proche de celle de la classe CESM22 (respectivement 2,27 et 2,06 Å), une analyse visuelle de la forme de ce site révèle une ouverture de la cavité principale différente entre ces deux classes. Ceci entraîne une différence de solvation pour les structures tirées de chaque classe. Alors que pour la classe CESM22, une couche d'eau peut s'insérer entre le ligand **308** et FKBP12, cette couche d'eau est absente lors de la solvata-

la partie Ph2.

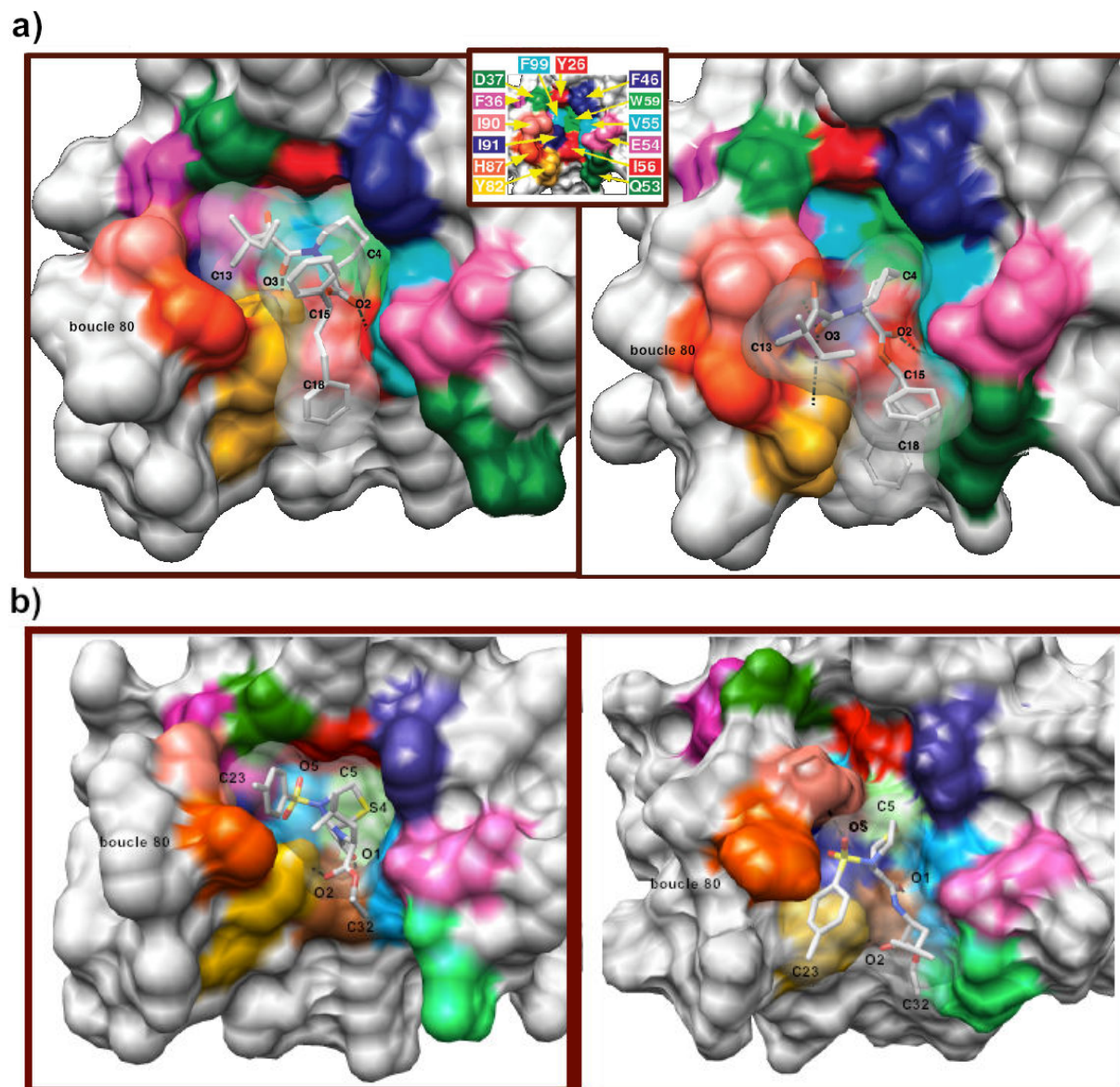


FIGURE 5.4 – Comparaison de la position des ligands (a) **8** et (b) **308** dans le site de fixation de FKBP12 dans SC (gauche) et dans EI (droite). Les couleurs utilisées pour les résidus de la protéine sont présentées dans l’encadré central. (a) Les interactions Ile56-NH \cdots O2 et Tyr82-OH \cdots O3 sont représentées par des tirets, ainsi que le contact Ile90-CG2 \cdots O3 présent seulement dans EI1. (b) Les interactions Ile56-NH \cdots O1 et Tyr82-OH \cdots O2 sont représentées par des tirets, ainsi que le contact Ile90-CD \cdots O5 présent seulement dans EI2.

tion des structures tirées de la classe CESM23. Ainsi, pour la classe CESM23, un enfoncement du ligand dans le site de fixation est attendu comme pour la classe CESM21. Donc, la classe CESM23 a également été abandonnée sur la base de l'absence d'une couche d'eau entre **308** et FKBP12. En résumé, pour le complexe FKBP12-**308**, un état intermédiaire a été stabilisé en utilisant des simulations SBD effectuées à partir de structures tirées des classes CESM22 et CESM24. Cet état intermédiaire, appelé par la suite EI2, correspond au regroupement des structures issues de 17 simulations SBD indépendantes pour une production d'environ 25 ns. Cet état intermédiaire est représenté en comparaison avec SC2 sur la figure 5.4 (b). Il est à préciser que, à l'issue des simulations SBD réalisées à partir des classes CESM22 et CESM24, deux autres ESM, différents de EI2, ont été obtenus. Seules des analyses préliminaires sont disponibles pour ces ESM mais elles ne permettent pas de les définir comme des états intermédiaires. Les informations semblent indiquer qu'il s'agit d'états proches de EI2 mais ne seront pas présentés par la suite.

Après comparaison des informations contenues dans le tableau 5.1 pour EI1 ou EI2 et les classes CESM respectives, il est possible d'observer des caractéristiques structurales similaires entre la classe CESM12 (structures issues de simulations LD avec l'utilisation de la méthode BMD) et EI1 (structures issues de simulations SBD). En effet, les différences pour toutes les valeurs de distances et de RMSD sont inférieures à ~ 1 Å, sauf pour la valeur de RMSD de la partie Ph2 dont la différence s'élève à 1,2 Å. De la même manière, pour EI2, les comparaisons font apparaître des similitudes entre les caractéristiques structurales de la classe CESM22 et celles de EI2. En effet, les différences pour les distances et RMSD sont inférieures à 0,75 Å, sauf pour les RMSD des parties Ethe et *i*Bu de **308** dont les différences s'élèvent respectivement à 1,34 et 1,14 Å. Cependant, il est nécessaire de rappeler que EI2 a été obtenu par des simulations SBD effectuées à partir de structures tirées des classes CESM22 et CESM24 (avec un plus grand nombre de simulations de EI2 issues des structures de CESM24). Or, la comparaison entre les d_{CM} et les RMSD du ligand **308** de EI2 et de CESM24 montrent des différences plus élevées (sauf pour la partie Ethe), avec notamment le d_{CM} et le RMSD pour la partie de cœur qui sont tous deux supérieurs de 3 Å dans CESM24 par rapport à EI2. Ainsi, il est intéressant d'observer que deux états différents obtenus par simulation en solvation implicite convergent vers un même état par simulation en solvation explicite. Il ressort de ces comparaisons que, malgré la

différence de représentation du solvant, il est possible d’obtenir des états à partir des deux types de simulation qui sont très proches en terme de structure des partenaires et de position du ligand dans le site de fixation de FKBP12. Toutefois, les différences montrent un enfoncement soit léger (pour EI1 et pour EI2 en comparaison respectivement avec CESM12 et CESM22), soit de manière un peu plus importante (pour EI2 en comparaison avec CESM24) du ligand dans le site de fixation dû probablement aux collisions des molécules d’eau.

3. Caractéristiques des états intermédiaires

Dans cette section, les caractéristiques des états intermédiaires EI1 et EI2 stabilisés précédemment par les simulations SBD sont présentées. Il est important de rappeler que les analyses des états intermédiaires reposent sur la condition que les résultats obtenus à partir d’une décomplexation sont également valables pour le processus inverse, en se basant sur des travaux précédents qui ont utilisé une approche similaire [57, 113]. Cette condition est ici satisfaisante du fait de l’utilisation de forces d’expulsion faibles et d’une représentation implicite du solvant pour la recherche initiale par décomplexation. Nous analyserons dans la suite l’intégrité structurale de la protéine et du ligand, la position relative du ligand dans le site de fixation ainsi que la mobilité des deux partenaires. Les interactions formées entre FKBP12 et le ligand dans les états intermédiaires seront également décrites. Les résultats présentés pour EI1 ont été publiés dans la revue *Journal of Chemical Theory and Computation* [38].

3.1. Structure des EI

La structure de la protéine a été analysée en effectuant des calculs de RMSD après avoir aligné les atomes C^α des structures de EI sur leurs positions de référence observées dans SC. Trois types d’alignement ont été utilisés afin de calculer les RMSD. Le premier type d’alignement, nommé alignement A1, correspond à un alignement de l’ensemble des atomes C^α sur leur position de référence. Les RMSD des atomes C^α de FKBP12 calculés en utilisant cet alignement permettent d’obtenir des informations sur les déviations de la structure de FKBP12 mais ne permettent pas de déterminer la nature de ces déviations (soit changement localisé de conformation d’une région, soit déplacement de région donnée par rapport au reste de la structure).

Pour les ligands par exemple, les RMSD des atomes lourds après alignement A1 permettent d'obtenir des informations sur le déplacement du ligand dans le site de fixation par rapport à sa position de référence. Le deuxième type d'alignement, nommé A2 et qui a été utilisé pour calculer d'autres valeurs de RMSD, aide à déterminer si un groupe de résidus G s'est déplacé par rapport au reste de la protéine : il correspond à l'alignement de tous les atomes C^α sauf ceux des résidus du groupe G. L'alignement de type A2 permet d'obtenir des valeurs de RMSD qui tiennent compte des déformations globales du groupe G (déplacement). Le troisième type, nommé A3, correspond à l'alignement uniquement des atomes C^α des résidus du groupe G sur leur position de référence. L'alignement de type A3 permet d'obtenir des informations sur la déformation locale d'un groupe G de résidus. Ainsi, en comparant les RMSD calculés à partir des atomes C^α après alignement selon A2 ou A3, il est parfois possible de préciser le groupe de résidus à l'origine des déviations de la structure de FKBP12^e.

Le tableau 5.2 présente, pour les deux états intermédiaires, les valeurs de RMSD des atomes C^α (colonne 1) des résidus de FKBP12 sauf ceux de la boucle 80 après alignement A1, (colonnes 2 et 3) de la boucle 80 après alignement soit A2, soit A3, et (colonnes 4 à 9) de sous-régions de cette boucle après alignement soit A2, soit A3 (Tyr82-His87, Pro88-Pro93 et His94-Ala95 pour EI1 et Tyr82-Gly83, Ala84-Pro93 et His94-Ala95 pour EI2). Pour obtenir les caractéristiques structurales de EI1, les RMSD reportés sont tous des moyennes d'ensemble calculées à partir des moyennes temporelles issues des simulations SBD de EI1 (*idem* pour EI2). Pour EI1, la valeur moyenne de RMSD calculée pour les atomes C^α des résidus qui ne sont pas dans la boucle 80 est égale à 0,81 Å, valeur légèrement inférieure à celle calculée pour EC1 obtenue par les simulations SBD (0,89 Å pour SBD1). Pour EI2, la valeur moyenne du même calcul de RMSD est égale à 1,11 Å, valeur inférieure à celle calculée pour EC2 obtenue par les simulations SBD (1,76 Å pour SBD2). En revanche, la valeur calculée après alignement A2 pour la boucle 80 qui entoure la cavité principale du site de fixation indique une déformation globale de cette boucle d'environ 3,5 et 4,0 Å respectivement dans EI1 et EI2 (obtenu par A2), ce qui est largement supérieur aux valeurs moyennes calculées pour les EC (de $\sim 1,7$ et $\sim 1,9$ Å). De plus, cette boucle subit une déformation locale un peu plus importante dans les EI que dans les EC (2,00 et

^e. Toutefois, lorsque les valeurs de RMSD obtenues après alignements A2 et A3 sont toutes les deux élevées et différentes, il est impossible de préciser la nature des déviations calculées.

2,14 Å dans EI et entre 1,29 et 1,44 Å dans EC obtenu par A3). Sur la figure 5.4, il est possible de constater la différence de conformation pour la boucle 80 dans EI par rapport à celle observée dans SC.

L'analyse des RMSD de la boucle 80 découpée pour EI1 en sous-régions Tyr82-His87, Pro88-Pro93 et His94-Ala95 révèle que seule une partie de cette boucle contribue de manière importante à la déformation globale (*i.e.* au déplacement) et à la déformation locale de la boucle 80. En effet, les sous-régions Tyr82-His87 et His94-Ala95 sont seulement légèrement déplacées (valeurs moyennes de RMSD obtenues par alignement A2 entre $\sim 1,6$ et $\sim 2,0$ Å). En revanche, le squelette de la sous-région Pro88-Pro93 présente de larges déviations d'environ 4,8 Å dans les simulations SBD de EI1 (obtenu par A2). Pour EI2, l'analyse des RMSD de la boucle 80 découpée en sous-régions Tyr82-Gly83, Ala84-Pro93 et His94-Ala95, indique que la première et la dernière ne se déplacent que faiblement (valeurs moyennes de RMSD obtenu par alignement A2 entre $\sim 1,3$ et $\sim 1,7$ Å). Comme pour la sous-région Pro88-Pro93 dans EI1, la sous-région Ala84-Pro93 subit un large déplacement d'environ 4,5 Å dans EI2 (obtenu par A2). De plus, dans les sous-régions Pro88-Pro93 pour EI1 et Ala84-Pro93 pour EI2, les déplacements les plus importants sont observés pour les résidus Gly89 et Ile90 (ces deux résidus ont des valeurs moyennes de RMSD obtenus par alignement A2 respectivement de 5,7 et 5 Å dans EI1, et de $\sim 5,7$ Å pour les deux dans EI2). Ces résidus sont localisés dans la petite portion riche en proline formant le sommet de la boucle 80. Il est à préciser que cette boucle comporte trois résidus glycine (Gly83, Gly86 et Gly89). Dans d'autres complexes protéine-ligand, la présence de résidus glycine proche du site de complexation a été décrite comme un élément majeur permettant la reconnaissance de ligands en favorisant les variations locales ou des changements de structure de boucles qui contribuent à l'entrée du ligand dans le site de fixation de la protéine [114, 115, 116]. Dans EI1, qui est supposé représenter une étape précédant la complexation, le déplacement facilité par le résidu Gly89 peut ainsi apparaître comme une stratégie efficace pour favoriser une interaction entre le résidu voisin Ile90 et la fonction dicétone (C8O3-C9O4) de **8** (*vide infra*). Des études précédentes sur FKBP12 ont démontré la déformation de la structure autour du résidu Gly89 ainsi que l'importance de la boucle 80 pour la reconnaissance des ligands. Par exemple, lors de la comparaison des structures de FKBP12 non-liée et liée avec différents ligands, une différence systématique de conformation du squelette de la sous-

région His87-Gly89 de la boucle 80 a été montré, avec des valeurs de RMSD pouvant atteindre 2 Å [117]. Dans une étude de la formation du complexe ternaire FKBP12-FK506-calcineurine, l'importance de la sous-région His87-Ile91 dans la reconnaissance de la calcineurine a également été démontrée [118]. En comparant les conformations de FKBP12 dans ses états non-lié et complexé avec FK506, Ivery et Weiler ont déduit que la boucle 80 devrait subir un déplacement dans son ensemble lors de la complexation avec le ligand FK506 [28]. La même conclusion a été tirée par Wilson *et al.* d'après leur comparaison des structures de FKBP12 non-liée avec celles de la protéine complexée avec FK506 et avec la rapamycine [104]. Toutes les conclusions de ces études ont donc suggéré un déplacement concerté de la boucle 80 lors de la complexation des ligands à FKBP12.

TABLEAU 5.2 – Analyse de la structure de FKBP12 dans EI1 et dans EI2. Les valeurs moyennes de RMSD (Å) des atomes C α de FKBP12 alignés sur la structure cristallographique en utilisant soit l'alignement A1, soit l'alignement A2, soit l'alignement A3 (voir sous-section 4.3 p. 100). Dans un but de comparaison, les valeurs moyennes calculées pour les états complexés sont indiquées.

RMSD des C α												
tous sauf boucle 80 (A1) boucle80 (A2) boucle80 (A3) Tyr82-His87 (A2) Tyr82-His87 (A3) Pro88-Pro93 (A2) Pro88-Pro93 (A3) His94-Ala95 (A2) His94-Ala95 (A3)												
SBD1	0,89 \pm 0,11	1,75 \pm 0,03	1,29 \pm 0,03	1,94 \pm 0,14	1,25 \pm 0,02	1,70 \pm 0,18	0,46 \pm 0,04	0,57 \pm 0,02	0,02 \pm 0,00			
EI11	0,76 \pm 0,03	3,31 \pm 0,28	2,19 \pm 0,23	1,62 \pm 0,33	0,99 \pm 0,14	4,57 \pm 0,44	1,11 \pm 0,14	2,30 \pm 0,47	0,03 \pm 0,02			
EI12	0,84 \pm 0,05	3,56 \pm 0,19	2,24 \pm 0,17	1,65 \pm 0,35	0,97 \pm 0,14	4,92 \pm 0,26	1,09 \pm 0,12	2,28 \pm 0,43	0,02 \pm 0,02			
EI13	0,81 \pm 0,04	3,49 \pm 0,24	2,26 \pm 0,18	1,68 \pm 0,39	0,99 \pm 0,14	4,82 \pm 0,34	1,09 \pm 0,09	2,22 \pm 0,45	0,03 \pm 0,02			
EI14	0,85 \pm 0,05	3,50 \pm 0,20	2,09 \pm 0,13	1,43 \pm 0,22	0,96 \pm 0,12	4,91 \pm 0,23	1,10 \pm 0,13	1,84 \pm 0,35	0,03 \pm 0,02			
EI15	0,83 \pm 0,04	3,49 \pm 0,23	2,10 \pm 0,11	1,50 \pm 0,23	0,94 \pm 0,10	4,92 \pm 0,33	1,07 \pm 0,11	2,04 \pm 0,36	0,02 \pm 0,02			
EI16	0,83 \pm 0,04	3,57 \pm 0,19	2,07 \pm 0,11	1,45 \pm 0,21	0,97 \pm 0,14	5,01 \pm 0,22	1,10 \pm 0,09	1,74 \pm 0,40	0,02 \pm 0,02			
EI17	0,79 \pm 0,04	3,29 \pm 0,25	2,05 \pm 0,21	1,84 \pm 0,54	0,91 \pm 0,12	4,43 \pm 0,39	0,93 \pm 0,25	1,83 \pm 0,36	0,02 \pm 0,02			
EI1	0,81 \pm 0,03	3,46 \pm 0,11	2,14 \pm 0,09	1,59 \pm 0,15	0,96 \pm 0,03	4,80 \pm 0,21	1,07 \pm 0,06	2,03 \pm 0,23	0,02 \pm 0,00			

RMSD des C α												
tous sauf boucle 80 (A1) boucle80 (A2) boucle80 (A3) Tyr82-Gly83 (A2) Tyr82-Gly83 (A3) Ala84-Pro93 (A2) Ala84-Pro93 (A3) His94-Ala95 (A2) His94-Ala95 (A3)												
SBD2	1,76 \pm 0,12	2,15 \pm 0,29	1,44 \pm 0,07	1,12 \pm 0,33	0,03 \pm 0,00	2,45 \pm 0,19	1,51 \pm 0,10	0,95 \pm 0,17	0,02 \pm 0,00			
EI221	1,20 \pm 0,06	4,77 \pm 0,37	1,83 \pm 0,12	1,67 \pm 0,52	0,03 \pm 0,02	5,23 \pm 0,37	1,45 \pm 0,12	1,78 \pm 0,43	0,02 \pm 0,02			
EI222	1,12 \pm 0,07	4,57 \pm 0,44	1,96 \pm 0,18	1,78 \pm 0,42	0,03 \pm 0,02	5,00 \pm 0,47	1,55 \pm 0,21	2,09 \pm 0,68	0,02 \pm 0,02			
EI223	1,13 \pm 0,06	4,14 \pm 0,30	2,02 \pm 0,10	1,58 \pm 0,28	0,03 \pm 0,02	4,68 \pm 0,33	1,31 \pm 0,09	1,93 \pm 0,24	0,02 \pm 0,02			
EI224	1,10 \pm 0,06	3,86 \pm 0,22	1,96 \pm 0,10	1,20 \pm 0,23	0,02 \pm 0,02	4,42 \pm 0,24	1,19 \pm 0,09	1,58 \pm 0,17	0,02 \pm 0,02			
EI225	1,14 \pm 0,06	4,06 \pm 0,34	2,04 \pm 0,09	1,24 \pm 0,23	0,02 \pm 0,02	4,66 \pm 0,39	1,27 \pm 0,08	1,64 \pm 0,15	0,02 \pm 0,02			
EI226	1,04 \pm 0,04	3,77 \pm 0,25	2,08 \pm 0,08	1,38 \pm 0,25	0,02 \pm 0,02	4,33 \pm 0,28	1,28 \pm 0,10	1,69 \pm 0,22	0,02 \pm 0,02			
EI227	1,07 \pm 0,05	3,77 \pm 0,21	2,00 \pm 0,12	1,22 \pm 0,24	0,03 \pm 0,02	4,33 \pm 0,23	1,24 \pm 0,11	1,56 \pm 0,16	0,02 \pm 0,02			
EI228	1,17 \pm 0,04	3,97 \pm 0,25	2,01 \pm 0,11	1,17 \pm 0,26	0,02 \pm 0,02	4,56 \pm 0,28	1,22 \pm 0,09	1,63 \pm 0,18	0,02 \pm 0,02			
EI229	1,19 \pm 0,04	4,13 \pm 0,22	1,99 \pm 0,09	1,28 \pm 0,24	0,03 \pm 0,02	4,74 \pm 0,24	1,22 \pm 0,09	1,55 \pm 0,19	0,02 \pm 0,02			
EI2210	1,06 \pm 0,04	3,97 \pm 0,30	1,98 \pm 0,09	1,40 \pm 0,25	0,03 \pm 0,02	4,53 \pm 0,32	1,24 \pm 0,10	1,81 \pm 0,26	0,02 \pm 0,02			
EI2211	1,08 \pm 0,04	3,71 \pm 0,23	2,01 \pm 0,10	1,14 \pm 0,24	0,03 \pm 0,02	4,26 \pm 0,25	1,20 \pm 0,09	1,59 \pm 0,18	0,02 \pm 0,02			
EI2212	1,02 \pm 0,04	3,80 \pm 0,22	1,99 \pm 0,13	1,34 \pm 0,29	0,03 \pm 0,02	4,39 \pm 0,25	1,16 \pm 0,12	1,62 \pm 0,16	0,02 \pm 0,02			
EI2213	1,12 \pm 0,05	4,05 \pm 0,25	2,03 \pm 0,09	1,17 \pm 0,22	0,02 \pm 0,02	4,65 \pm 0,28	1,23 \pm 0,08	1,64 \pm 0,18	0,02 \pm 0,02			
EI2214	1,10 \pm 0,05	3,96 \pm 0,23	2,02 \pm 0,10	1,21 \pm 0,23	0,02 \pm 0,02	4,56 \pm 0,26	1,26 \pm 0,09	1,65 \pm 0,19	0,02 \pm 0,02			
EI2215	1,11 \pm 0,05	4,03 \pm 0,29	1,99 \pm 0,13	1,33 \pm 0,25	0,03 \pm 0,02	4,60 \pm 0,31	1,22 \pm 0,10	1,80 \pm 0,26	0,02 \pm 0,02			
EI2216	1,04 \pm 0,06	3,74 \pm 0,31	2,03 \pm 0,09	1,37 \pm 0,31	0,03 \pm 0,02	4,27 \pm 0,34	1,25 \pm 0,10	1,99 \pm 0,30	0,02 \pm 0,02			
EI2217	1,09 \pm 0,04	3,96 \pm 0,25	2,01 \pm 0,12	1,34 \pm 0,30	0,03 \pm 0,02	4,52 \pm 0,28	1,21 \pm 0,12	1,92 \pm 0,24	0,02 \pm 0,02			
EI2	1,11 \pm 0,05	4,01 \pm 0,28	2,00 \pm 0,05	1,34 \pm 0,18	0,03 \pm 0,00	4,57 \pm 0,25	1,27 \pm 0,10	1,73 \pm 0,16	0,02 \pm 0,00			

Afin de vérifier si, la boucle 80 subit un déplacement concerté lors des conversions entre états $EC \rightleftharpoons EI$, il est intéressant de remarquer que dans SC les chaînes latérales des résidus Tyr82, His87, Ile90 et Ile91 (les plus volumineuses de cette boucle) sont regroupées et forment un cœur hydrophobe cylindrique dont le bord supérieur définit une petite cavité vers laquelle pointe l'atome 8-C13 dans SC1 et, dans SC2, le côté de la partie Tol de **308** formé par les atomes **308**-C21 à **308**-C23 ; cette cavité est en forme de gant de baseball (voir la partie gauche des figures 5.4 (a) et (b)). Partant de cette constatation, six distances séparant les centres de masse des chaînes latérales de ces quatre résidus ont été mesurées afin de comparer les valeurs obtenues dans EI et EC. Les valeurs moyennes de distance pour EC et EI sont reportées dans le tableau 5.3.

La comparaison entre les valeurs de EI1 et EC1 montrent des différences en valeur absolue inférieures à 0,6 Å, sauf pour les distances His87... Ile91. Les différences entre les valeurs de EI1 et EC1 pour les distances impliquant le résidu Ile91 sont toutes positives et comprises entre 0,40 et 1,14 Å ce qui traduit un éloignement plus ou moins important de la chaîne latérale de ce résidu par rapport aux chaînes latérales des autres résidus. À l'inverse, pour les autres couples les valeurs sont toutes négatives et comprises entre -0,05 et -0,58 Å, ce qui traduit un rapprochement de ces chaînes latérales. En combinant ces deux observations il est possible d'en déduire que les chaînes latérales des résidus Tyr82, His87 et Ile90 se déplacent de manière concertée en s'éloignant toutefois légèrement de la chaîne latérale du résidu Ile91. Ce déplacement peut être observé en comparant les images de gauche et de droite sur la figure 5.4 (a).

Pour EI2, les différences par rapport à EC2 sont en valeur absolue supérieures à 0,4 Å sauf pour celles associées aux distances His87... Ile90 et Ile90... Ile91. Des valeurs de différence proches de 2,3 Å sont observés pour les distances Tyr82... His87 et His87... Ile91. Dans le cas de EC2 et EI2, la comparaison entre les six couples de distance séparant les centres de masse des chaînes latérales formant la cavité ne permet pas de déterminer le déplacement relatif des chaînes latérales. Toutefois, en comparant les images de gauche et de droite sur la figure 5.4 (b), il semblerait que le déplacement concerté de ces chaînes latérales dans ce cas s'accompagne d'un déplacement plus important pour les chaînes latérales de Tyr82 et His87 entre lesquelles viennent s'insérer la partie Tol et la sous-partie S8O4O5 de **308** pour former de nombreuses interactions (section 3.4. p. 150).

TABLEAU 5.3 – Analyse de la déformation de la petite cavité latérale du site de fixation formée par les chaînes latérales volumineuses de la boucle 80 (Tyr82, His87, Ile90 et Ile91) pour les complexes FKBP12-**8** (gauche) et FKBP12-**308** (droite). Les valeurs moyennes accompagnées de leurs déviations standards pour les distances (Å) de séparation entre les centres de masse de ces chaînes latérales des résidus obtenues à partir des structures issues des simulations SBD de EI et de EC.

d_{CM}		EC1	EI1	EI1–EC1	EC2	EI2	EI2–EC2
Tyr82	His87	$5,38 \pm 0,27$	$5,27 \pm 0,14$	–0,11	$5,65 \pm 0,19$	$7,90 \pm 0,6$	2,25
Tyr82	Ile90	$9,33 \pm 0,10$	$8,75 \pm 0,49$	–0,58	$9,60 \pm 0,18$	$8,91 \pm 0,22$	–0,69
Tyr82	Ile91	$5,43 \pm 0,10$	$5,84 \pm 0,32$	0,41	$5,25 \pm 0,11$	$4,81 \pm 0,16$	–0,44
His87	Ile90	$6,03 \pm 0,18$	$5,98 \pm 0,23$	–0,05	$6,12 \pm 0,24$	$6,01 \pm 1,5$	–0,11
His87	Ile91	$6,09 \pm 0,19$	$7,23 \pm 0,33$	1,14	$5,97 \pm 0,28$	$8,33 \pm 0,66$	2,36
Ile90	Ile91	$5,72 \pm 0,03$	$6,12 \pm 0,04$	0,40	$5,90 \pm 0,04$	$5,99 \pm 0,11$	0,09

La combinaison des résultats des analyses de la boucle 80, *i.e.* RMSD des sous-régions de celle-ci et des distances de séparation entre les centres de masse de ses chaînes latérales volumineuses, révèle (i) un changement de conformation du sommet de cette boucle dans la région Pro88-Pro93 (déformation locale accrue pour le résidu Gly89) et (ii) un déplacement concerté de la majorité des chaînes latérales volumineuses de cette boucle lors des conversions entre états $EC \rightleftharpoons EI$.

3.2. Position du ligand dans le site de fixation de FKBP12

Le déplacement du ligand dans le site de fixation de FKBP12 entre SC ou EC et EI a été analysé grâce à (i) la mesure des distances entre les centres de masse de chaque partie du ligand et le centre de masse du site de fixation de FKBP12 (d_{CM}), (ii) des distances d_{RC} et (iii) des calculs de RMSD des atomes lourds de chaque partie du ligand après alignement des atomes C^α de FKBP12 sur leur position dans SC (alignement A1). Les valeurs moyennes de d_{CM} et de RMSD obtenues pour EI1 et EI2, celles calculées pour EC1 et EC2 ainsi que les valeurs de référence pour les d_{CM} mesurées sur SC1 et SC2 sont présentées dans le tableau 5.4. Les

valeurs de déviation standard associées aux valeurs moyennes des d_{CM} et des RMSD pour EI1 et EI2 sont toutes inférieures à $\sim 0,4$ Å. Ces faibles valeurs de déviation peuvent être reliées à une homogénéité des résultats obtenus pour toutes les simulations d'un même type. Les valeurs moyennes de RMSD et de d_{CM} montrent que la partie du ligand qui se déplace le moins entre l'état intermédiaire et l'état complexé correspond à la partie Ph1 de **8** pour EI1 et Ethe de **308** pour EI2 (différences respectives de $\sim 1,3$ et $\sim 1,7$ Å par rapport à EC1, et de $\sim 3,4$ et $\sim 2,6$ Å par rapport à EC2). À l'inverse, la partie du ligand qui se déplace le plus entre EI et EC correspond à l'autre extrémité du ligand, la partie *i*Pe pour **8** et Tol pour **308**. Ces deux dernières parties sont celles qui interagissent dans EC1 et EC2 avec la cavité latérale du site de fixation formée par les chaînes latérales volumineuses de la boucle 80 et qui se déplace de manière concertée entre EC et EI afin de permettre au ligand rentrant d'interagir avec cette cavité plus exposée dans EI. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que, dans les conversions entre états $EC \rightleftharpoons EI$, le large déplacement des parties *i*Pe de **8** et Tol de **308** est concerté avec le déplacement et l'exposition de la cavité latérale de la boucle 80.

TABLEAU 5.4 – Analyse du déplacement des ligands **8** et **308** dans le site de fixation de FKBP12 respectivement entre EI1 et SC1/EC1 et entre EI2 et SC2/EC2. Les valeurs moyennes accompagnées de leurs déviations standards pour les d_{CM} (Å) obtenues à partir des structures issues des simulations SBD de EI sont comparées avec celles mesurées dans SC (lignes SC1 et SC2). Les valeurs moyennes de RMSD du ligand présentées dans ce tableau ont été calculées pour les atomes lourds de chaque partie du ligand après alignement des atomes C^α des résidus de FKBP12 sur leurs positions observées dans la structure cristallographique. Les valeurs moyennes de la distance choisie comme coordonnée de réaction sont également indiquées ; d_{RC1} correspond à la distance **8**-O1...Glu5- C^α et d_{RC2} à la distance **308**-N7...Glu5- C^α .

d _{CM}						RMSD atomes lourds (Å)					
	ligand 8	Ph1	Ph2	cœur	<i>i</i> Pe	d _{RC1}	ligand 8	Ph1	Ph2	cœur	<i>i</i> Pe
SC1	4,75	9,24	7,42	2,21	5,61	20,10					
SBD1	15,23 ± 0,05	9,72 ± 0,19	7,88 ± 0,09	2,73 ± 0,03	6,26 ± 0,07	20,36 ± 0,03	1,87 ± 0,17	2,88 ± 0,35	1,79 ± 0,29	0,85 ± 0,05	2,20 ± 0,88
EI1	8,91 ± 0,38	11,59 ± 0,73	11,22 ± 0,47	7,15 ± 0,40	11,20 ± 0,48	23,50 ± 0,36	6,25 ± 0,45	4,14 ± 0,60	7,10 ± 0,59	6,03 ± 0,48	8,44 ± 0,74
EI2	8,93 ± 0,39	11,84 ± 0,57	11,01 ± 0,43	7,20 ± 0,44	11,33 ± 0,45	23,34 ± 0,36	6,37 ± 0,51	4,21 ± 0,60	7,07 ± 0,69	6,15 ± 0,51	8,79 ± 0,66
EI3	8,93 ± 0,28	11,73 ± 0,44	11,31 ± 0,40	7,11 ± 0,29	11,31 ± 0,33	23,60 ± 0,33	6,19 ± 0,33	4,09 ± 0,43	6,96 ± 0,50	5,94 ± 0,34	8,50 ± 0,50
EI4	8,92 ± 0,28	11,74 ± 0,41	11,31 ± 0,43	7,14 ± 0,33	11,21 ± 0,34	23,52 ± 0,34	6,34 ± 0,35	4,20 ± 0,48	7,39 ± 0,51	6,05 ± 0,38	8,46 ± 0,46
EI5	8,81 ± 0,41	11,52 ± 0,84	10,96 ± 0,50	7,16 ± 0,42	11,30 ± 0,42	23,27 ± 0,36	6,36 ± 0,44	4,42 ± 0,52	7,04 ± 0,53	6,09 ± 0,49	8,75 ± 0,61
EI6	8,86 ± 0,29	11,51 ± 0,60	11,36 ± 0,39	7,11 ± 0,34	11,24 ± 0,40	23,58 ± 0,33	6,25 ± 0,41	4,22 ± 0,46	7,15 ± 0,59	5,95 ± 0,40	8,50 ± 0,55
EI7	8,56 ± 0,35	10,99 ± 0,61	11,20 ± 0,39	6,83 ± 0,35	11,07 ± 0,40	23,49 ± 0,33	5,93 ± 0,43	3,79 ± 0,61	6,72 ± 0,70	5,65 ± 0,38	8,25 ± 0,58
EI1	8,84 ± 0,13	11,56 ± 0,28	11,20 ± 0,15	7,10 ± 0,12	11,24 ± 0,09	23,47 ± 0,12	6,24 ± 0,15	4,15 ± 0,19	7,06 ± 0,20	5,98 ± 0,16	8,53 ± 0,19

	d _{CM}				d _{RC1}	RMSD atomes lourds (Å)								
	ligand 8	Ethe	iBu	cœur		ligand 8	Ethe	iBu	cœur	Tol				
SC2	3,24	6,07	5,16	1,34	18,51									
SBD23,15	± 0,126,09	± 0,095,79	± 0,231,24	± 0,104,80	± 0,06	18,96	± 0,10	1,42	± 0,211,18	± 0,122,38	± 0,380,51	± 0,041,53	± 0,42	
EI21	7,67	± 0,329,24	± 0,709,38	± 0,454,88	± 0,369,22	± 0,44	23,28	± 0,49	6,86	± 0,465,08	± 0,387,81	± 0,605,90	± 0,448,82	± 0,65
EI22	7,56	± 0,488,79	± 0,819,05	± 0,645,11	± 0,359,41	± 0,45	23,93	± 0,35	6,98	± 0,555,07	± 0,597,84	± 0,686,10	± 0,468,96	± 0,75
EI23	7,25	± 0,318,47	± 0,289,61	± 0,565,21	± 0,328,33	± 0,40	23,58	± 0,34	6,53	± 0,344,23	± 0,428,01	± 0,915,95	± 0,347,92	± 0,44
EI24	7,24	± 0,258,45	± 0,299,05	± 0,304,90	± 0,318,72	± 0,33	23,23	± 0,32	6,14	± 0,354,10	± 0,397,12	± 0,505,53	± 0,347,74	± 0,47
EI25	7,43	± 0,328,61	± 0,309,27	± 0,315,21	± 0,348,73	± 0,49	23,51	± 0,34	6,67	± 0,414,60	± 0,407,72	± 0,536,02	± 0,398,31	± 0,57
EI26	7,40	± 0,248,57	± 0,329,18	± 0,285,15	± 0,308,84	± 0,37	23,61	± 0,31	6,72	± 0,324,59	± 0,397,72	± 0,476,09	± 0,338,40	± 0,42
EI27	7,35	± 0,288,48	± 0,329,15	± 0,315,10	± 0,368,82	± 0,37	23,43	± 0,34	6,38	± 0,454,23	± 0,467,36	± 0,555,80	± 0,427,98	± 0,65
EI28	7,41	± 0,278,63	± 0,289,14	± 0,315,16	± 0,308,94	± 0,37	23,44	± 0,31	6,53	± 0,394,52	± 0,377,58	± 0,505,88	± 0,378,13	± 0,54
EI29	7,33	± 0,258,63	± 0,319,21	± 0,355,11	± 0,318,63	± 0,31	23,50	± 0,32	6,56	± 0,314,55	± 0,377,49	± 0,515,96	± 0,338,17	± 0,42
EI2107,60	± 0,429,09	± 0,659,52	± 0,635,38	± 0,508,60	± 0,41	23,80	± 0,46	6,52	± 0,354,68	± 0,557,24	± 0,666,09	± 0,437,92	± 0,48	
EI2117,25	± 0,278,40	± 0,299,08	± 0,345,00	± 0,328,69	± 0,46	23,34	± 0,33	6,17	± 0,354,05	± 0,387,03	± 0,555,62	± 0,377,76	± 0,54	
EI2127,90	± 0,489,56	± 0,929,67	± 0,505,14	± 0,349,20	± 0,44	23,46	± 0,40	6,87	± 0,415,09	± 0,547,78	± 0,606,05	± 0,378,69	± 0,61	
EI2137,64	± 0,308,69	± 0,339,34	± 0,305,36	± 0,339,14	± 0,47	23,62	± 0,31	6,84	± 0,414,68	± 0,417,82	± 0,506,13	± 0,378,64	± 0,60	
EI2147,46	± 0,248,63	± 0,319,23	± 0,285,19	± 0,308,90	± 0,38	23,52	± 0,30	6,70	± 0,324,61	± 0,377,73	± 0,446,01	± 0,338,42	± 0,45	
EI2157,50	± 0,288,65	± 0,439,32	± 0,325,28	± 0,368,83	± 0,40	23,55	± 0,36	6,53	± 0,354,37	± 0,457,50	± 0,475,95	± 0,378,14	± 0,51	
EI2167,51	± 0,358,54	± 0,349,16	± 0,355,13	± 0,389,11	± 0,51	23,65	± 0,34	6,91	± 0,464,72	± 0,407,90	± 0,556,13	± 0,418,82	± 0,68	
EI2177,46	± 0,288,59	± 0,299,36	± 0,315,26	± 0,318,82	± 0,48	23,68	± 0,33	6,64	± 0,354,48	± 0,417,69	± 0,506,04	± 0,358,25	± 0,49	
EI2	7,47	± 0,178,71	± 0,319,28	± 0,195,15	± 0,148,88	± 0,27	23,54	± 0,18	6,62	± 0,244,57	± 0,327,61	± 0,285,96	± 0,178,30	± 0,38

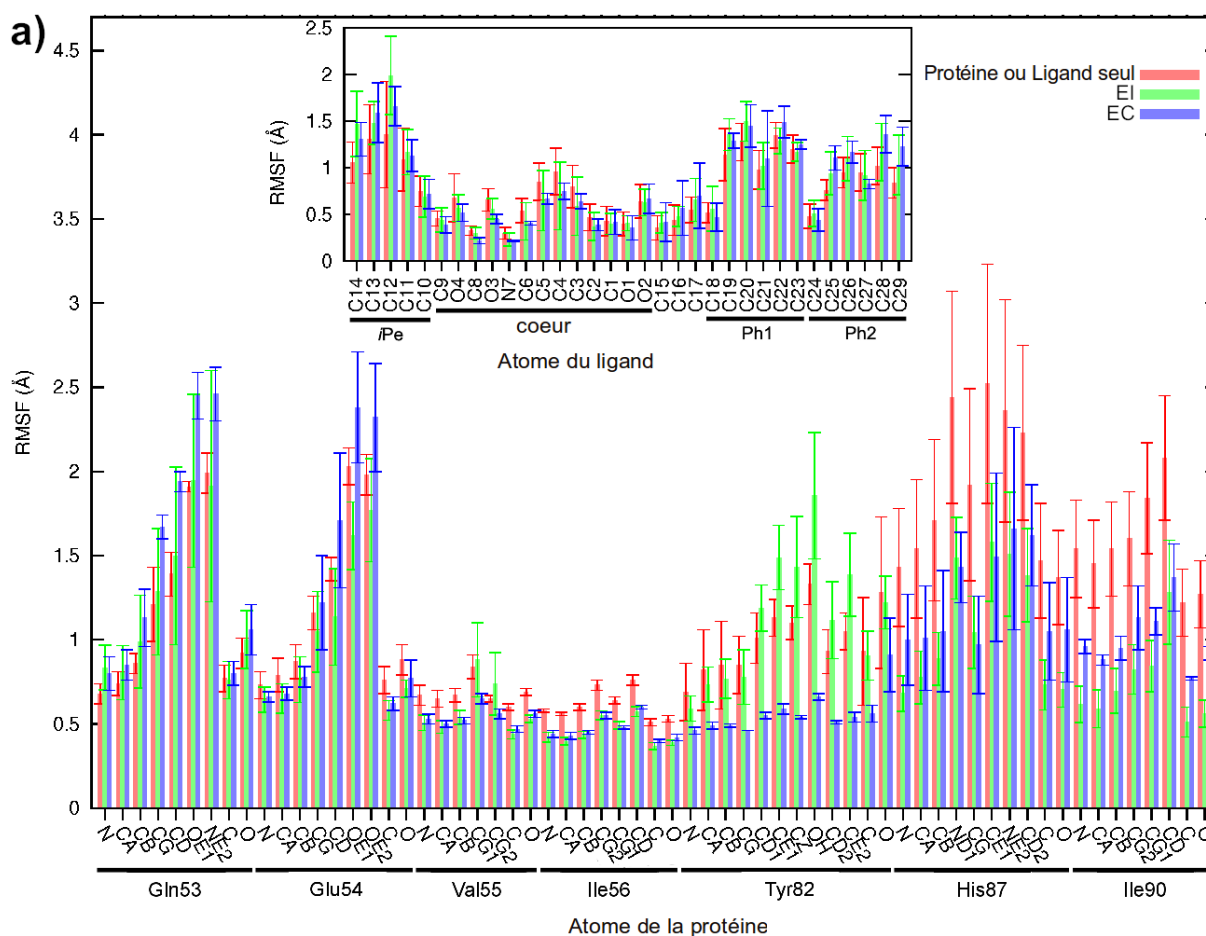
Il est intéressant de noter que la position du cœur de **8** dans EI1 est déplacée de 4,6 Å par rapport à sa position dans SC1 (valeur moyenne de d_{CM} de 6,37 Å dans EI1 et valeur de 1,73 Å dans SC1). Cette valeur de distance est similaire à la valeur de 4,5 Å séparant les deux surfaces des protéines dans l'état intermédiaire trouvé pour le complexe barnase-barstar [119]. Pour la partie de cœur de **308**, son déplacement dans EI2 par rapport à sa position dans SC2 est légèrement moins important (3,8 Å). Toutefois, ce déplacement permet la présence d'une couche d'eau entre les deux partenaires qui peut empêcher l'enfoncement du ligand **308** dans le site de fixation et ainsi stabiliser sa position, comme indiqué auparavant lors de l'étape de sélection des candidats pour EI2 (p. 135).

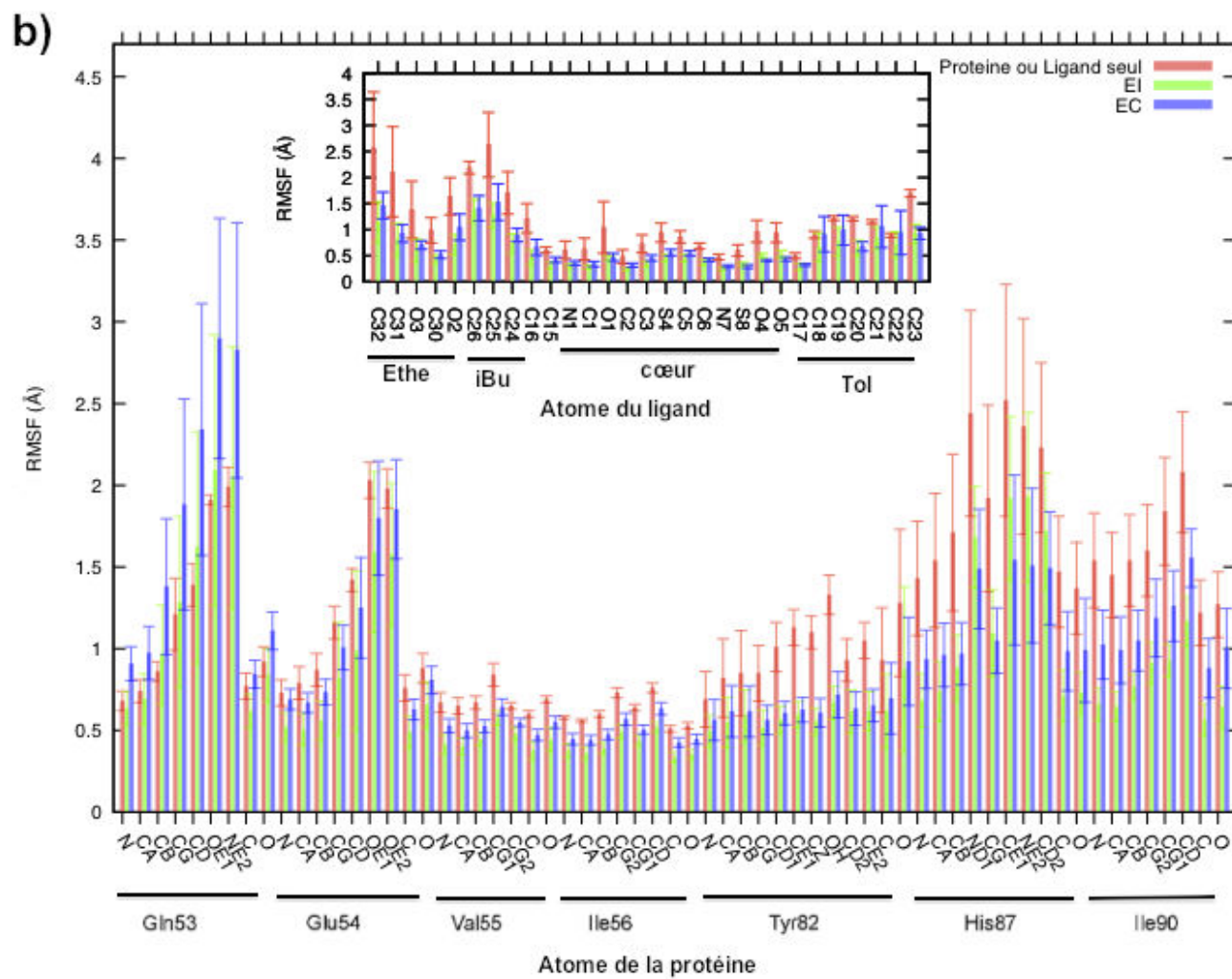
3.3. Mobilité de FKBP12 et du ligand

Les RMSF des atomes des résidus de FKBP12 formant au moins deux interactions permanentes avec le ligand (voir aussi sous-section 3.4. p. 150 et figure 5.11 p. 174 pour la discussion sur les interactions) ont été calculés pour les simulations des EI et comparés avec les valeurs obtenues pour les simulations de la protéine seule et de EC correspondant (figure 5.5). Pour le complexe FKBP12-**8**, les RMSF des résidus Gln53-Ile56 sont presque identiques pour les trois états de la protéine (sauf respectivement pour les fonctions amide et carboxate des résidus Gln53 et Glu54). Au contraire, pour les résidus Tyr82, His87 et Ile90 qui font partie de la boucle 80, les valeurs de RMSF varient entre les trois états de la protéine. En passant de l'état de libre diffusion des deux partenaires vers EI1, les RMSF des atomes de la chaîne latérale du résidu Tyr82 augmente de 20 à 30% (sauf pour les atomes C^β et C^γ), tandis que les atomes du squelette et des chaînes latérales des résidus His87 et Ile90 présentent des RMSF plus faibles de 40 à 50%. Pour le passage de EI1 vers EC1, les valeurs de RMSF diminuent vers des valeurs de 0,5 à 0,7 Å pour les atomes de la chaîne latérale du résidu Tyr82 et ne varient que très peu pour les résidus His87 et Ile90 (augmentations inférieures à 0,35 Å entre EI1 et EC1).

Pour le complexe FKBP12-**308**, les RMSF des résidus Glu54-Ile56 sont presque identiques (différences inférieures à 0,3 Å entre chaque état) pour les trois états de la protéine, sauf pour la fonction carboxate du résidu Glu54 (différences entre la protéine seule et EI2 d'environ 0,4 Å). Au contraire, pour le résidu Gln53 et les résidus Tyr82, His87 et Ile90 qui font partie de la boucle 80, les valeurs de RMSF varient entre deux des trois états de la protéine. Pour le résidu

FIGURE 5.5 – Histogramme des valeurs moyennes avec les déviations standards des RMSF calculées pour les résidus qui forment des contacts avec le ligand **8** dans EI1 (a) et le **308** dans EI2 (b). Les valeurs correspondantes calculées pour EC sont reportées afin de pouvoir comparer les deux états. Les valeurs de RMSF des atomes lourds du ligand calculées pour EI et EC sont montrées dans l’encart. Dans un but de comparaison, les valeurs moyennes de RMSF des résidus Gln53, Glu54, Val55, Ile56, Tyr82, His87 et Ile90 calculées à partir de quatre simulations SBD indépendantes de 2 ns de la protéine seule sont indiquées. De même, les valeurs moyennes de RMSF des atomes lourds des ligands **8** et **308** ont été calculées à partir de respectivement cinq et trois simulations SBD indépendantes de 2 ns du ligand seul.





Gln53, une augmentation d'environ 0,8 Å est observée pour la fonction amide lors du passage de EI2 vers EC2, tandis que les RMSF des atomes du squelette sont équivalents. Pour le résidu Tyr82, une diminution de 0,31 à 0,66 Å des RMSF de tous ses atomes est observée lors du passage de l'état de libre diffusion vers EI2. Pour les résidus His87 et Ile90, une diminution de 0,4 à 0,9 Å des RMSF de leurs atomes est observée lors du passage de l'état de libre diffusion vers EI2. Lors du passage de EI2 vers EC2, les valeurs pour les autres atomes restent à peu près constantes, sauf pour Ile90 (augmentation de $\sim 0,3$ Å pour ses atomes) et quelques atomes de la chaîne latérale de His87 (diminution entre 0,2 et 0,9 Å).

De la même manière que pour FKBP12, l'évolution de la mobilité des atomes du ligand entre les différents états a été suivie en comparant les valeurs de RMSF associées au ligand seul, à EI et à la structure cristallographique (cadre inséré dans la figure 5.5). Les RMSF de chaque atome lourd ont été analysées afin de pouvoir observer les mobilités des parties de chaque ligand. Pour le ligand **8**, les valeurs de RMSF calculées pour les trois états sont étonnement similaires avec seulement des valeurs légèrement plus élevées dans EI1 pour les atomes **8**-C12 et **8**-C14. Ce résultat semble indiquer que lors de la complexation de **8** à FKBP12, sa mobilité est conservée malgré la formation des premiers contacts dans EI1. Alors qu'une diminution de la mobilité des parties interagissant avec FKBP12 serait *a priori* attendue lors du passage de EI vers EC, nous remarquons qu'il n'y a pas de perte de fluctuations atomiques, ces fluctuations atomiques décrivant une part de la mobilité du ligand. Ainsi, entre FKBP12 et **8** dans leur état de libre diffusion et EI1, les interactions intermoléculaires naissantes dans EI1 contribuent à diminuer le terme ΔH qui serait calculé entre ces deux états. De plus, en raisonnant sur le ligand uniquement, une mobilité conservée pour **8** permet de ne pas contribuer à diminuer le terme ΔS entre ces deux états.

Pour le ligand **308**, lors du passage de l'état de libre diffusion vers EI2, les valeurs de RMSF de tous les atomes sont diminuées de plus de $\sim 0,3$ Å sauf pour **8**-(C2, N7, C17, C22) (dont les RMSF sont diminués de 0,2 Å). En particulier, ces diminutions concernent les parties périphériques : les atomes de la partie Ethe et l'atome **308**-C23 de Tol ont des valeurs diminuées de 0,6 à 1,4 Å. Toutefois, les RMSF de la plupart des atomes lourds des extrémités des parties périphériques restent dans l'intervalle ~ 1 -1,5 Å. En passant de EI2 vers EC2, les valeurs de RMSF sont à peu près constantes avec seulement de légères augmentations de 0,3 Å pour les

atomes **308**-(C32, O2). Ainsi, contrairement à ce qui est observé pour le ligand **8**, la diminution de la mobilité des atomes lors du passage de l'état de libre diffusion permet d'anticiper une perte de l'entropie pour le ligand dans ce cas. Cependant, cette perte entropique pour le ligand est, nous le verrons dans la sous-section 3.4. p. 150, au moins compensée par de nombreuses interactions qui apparaissent entre FKBP12 et **308** dans EI2. Entre EI2 et EC2 en revanche, la mobilité similaire dans ces deux états pour les atomes du ligand semble indiquer que l'entropie est conservée entre ces deux états.

3.4. Analyse des interactions formées dans les EI

Malgré la grande mobilité qui semble conservée lors du passage entre l'état de libre diffusion des deux partenaires et EI1, la position du ligand **8** dans le site de fixation est stable. Pour le ligand **308**, même si une diminution de la mobilité de ces atomes lourds est observée, certaines sous-parties des parties périphériques sont toujours mobiles. Afin de comprendre l'origine de la stabilité de la position du ligand, les interactions formées entre le ligand et FKBP12 ont été analysées pour ces deux états.

3.4.1. Analyse des interactions permanentes

Dans cette section, les contacts formés entre le ligand et FKBP12 ont été analysés en recherchant ceux qui sont conservés tout au long des simulations SBD de EI. Comme pour EC, les contacts présentant des distances moyennes inférieures ou égales à 4 Å définissent les interactions permanentes pour EI. Pour limiter notre étude, les distances reportées sont celles qui sont inférieures ou égales à 4 Å et qui sont observées dans plus de 50% des structures issues d'au moins une des simulations pour EI. Dans les tableaux 5.5 et 5.6, les valeurs moyennes pour ces distances ont été obtenues à partir des structures d'une simulation et pour l'ensemble des simulations SBD de EI. Pour la plupart des couples d'atomes présentés dans ce tableau, les distances moyennes de séparation des atomes sont comprises entre 4 et 5,8 Å avec des déviations standards allant de 0,1 jusqu'à des valeurs élevées telles que 1,2 Å. Il est frappant de constater que très peu de contacts possèdent des valeurs de distance inférieures à 4 Å. Pour EI1, seuls deux groupes d'interactions permanentes sont observés entre Ile90-C γ^2 et les atomes **8**-C8 et **8**-O3, d'une part (distances moyennes comprises entre 3,83 et 3,92 Å), et entre les atomes

Ile56-(N, C γ^2), Val55-(C, C α) et 8-O2, d'autre part (distances moyennes comprises entre 3,30 et 3,47 Å). Les déviations standards pour ces distances associées à des interactions permanentes sont inférieures à 0,07 Å, ce qui indique une homogénéité pour ces distances entre toutes les simulations SBD de EI1. L'atome C γ^2 du résidu Ile90 forme également un contact avec l'atome 8-O4 dont la distance moyenne s'élève à 3,97 Å. Toutefois, la déviation standard autour de cette valeur moyenne est de 0,11 Å à cause de distances légèrement supérieures à 4 Å pour trois simulations. Ceci montre donc que cette interaction n'est pas conservée dans toutes les simulations SBD de EI1. L'atome d'oxygène du squelette du résidu Glu54 forme également trois contacts dont les distances sont proches de 3,9 Å. Cependant, les valeurs des distances de ces trois contacts sont associées à des déviations standards allant de 0,28 à 0,5 Å, ce qui indique que ces contacts sont absents dans certaines simulations SBD de EI1. Les interactions permanentes associées à de faibles déviations standards (inférieures à 0,25 Å), *i.e.* celles présentes dans toutes les simulations, sont au nombre de sept.

TABLEAU 5.5 – Valeurs moyennes des distances (Å) de certains contacts formés entre FKBP12 et le ligand **8** dans EI1. Les contacts ont été analysés lorsque les valeurs de distances sont inférieures ou égales à 4 Å dans plus de 50 % des structures d’au moins une simulation. Les domaines de fluctuation (Å) reportés représentent les valeurs minimale et maximale de fluctuation autour de chaque moyenne observées pour l’ensemble des simulations SBD.

Paire d’atomes		Ligand 8	EI11	EI12	EI13	EI14	EI15	EI16	EI17	domaine de fluctuations	EI1	déviaton standard
Gln53	O	C29	5,67	6,14	4,36	4,26	6,16	5,88	4,87	0,45-1,08	5,33	0,82
		C26	3,82	4,18	5,19	5,42	3,92	3,83	4,65	0,57-1,01	4,43	0,67
		C25	3,91	4,24	4,81	5,18	4,17	3,74	4,19	0,51-1,10	4,32	0,51
Glu54	O	C29	4,80	5,03	4,22	3,92	5,29	5,10	4,99	0,42-0,88	4,76	0,50
		C26	4,54	4,05	5,23	5,30	3,94	4,37	5,18	0,43-0,80	4,66	0,57
		C25	3,75	3,49	4,46	4,66	3,46	3,50	4,21	0,33-0,87	3,93*	0,50
		C24	3,94	4,07	3,97	3,98	4,25	3,95	4,14	0,36-0,47	4,04	0,12
		C15	3,84	4,24	3,78	3,91	4,47	3,79	3,70	0,34-0,69	3,96*	0,28
		O1	4,04	4,61	3,99	4,21	4,84	3,99	3,97	0,38-0,61	4,24	0,35
		C1	3,97	4,56	3,91	4,18	4,73	3,92	3,83	0,36-0,48	4,16	0,35
		O2	3,74	4,24	3,74	3,96	4,36	3,74	3,62	0,37-0,52	3,92*	0,28

Paire d'atomes												
FKBP12	Ligand	8EI11	EI12	EI13	EI14	EI15	EI16	EI17	domaine de fluctuations	EI1	déviati on standard	
Glu54	O	4,29	4,88	4,13	4,49	4,96	4,24	4,08	0,52-0,79	4,44	0,35	
	C	4,26	4,08	5,17	5,44	4,07	4,07	4,77	0,35-0,97	4,55	0,58	
Val55	O2	3,43	3,52	3,40	3,47	3,52	3,40	3,35	0,25-0,37	3,44*	0,07	
	O	4,08	4,37	4,08	4,24	4,39	4,09	3,99	0,37-0,45	4,17	0,16	
	C α	3,53	3,44	3,46	3,48	3,45	3,48	3,42	0,22-0,40	3,46*	0,04	
Ile56	O2	3,34	3,29	3,31	3,30	3,27	3,28	3,32	0,24-0,34	3,30*	0,03	
	C α	4,07	4,16	4,05	4,08	4,13	4,01	4,06	0,26-0,37	4,08	0,05	
	C γ^2	3,45	3,52	3,45	3,48	3,52	3,40	3,48	0,25-0,34	3,47*	0,04	
Tyr82	O	4,72	5,00	4,85	5,41	5,40	5,42	4,05	0,71-1,68	4,98	0,50	
	C ϵ^2	4,46	4,21	4,35	3,96	4,35	3,96	5,31	0,54-1,67	4,37	0,46	
	C ζ	5,11	4,80	4,15	4,37	4,90	4,22	5,99	0,63-1,78	4,79	0,64	
	O η	5,31	4,69	4,08	4,18	4,72	4,06	5,75	0,73-1,69	4,69	0,65	
		5,74	5,17	4,17	4,36	5,21	4,13	6,19	0,96-2,00	5,00	0,80	
	C8	5,70	5,28	4,37	4,62	5,36	4,43	6,78	0,90-2,13	5,22	0,86	
	O3	4,94	4,58	3,58	3,94	4,62	3,66	6,05	0,99-2,21	4,48	0,87	

Paire d'atomes		Ligand	EI11	EI12	EI13	EI14	EI15	EI16	EI17	domaine de fluctuations	EI	déviati on standard
FKBP12	His87	C ^γ	4,27	5,48	6,03	4,06	5,91	5,80	6,29	0,78-1,53	5,41	0,88
		C ^{δ2}	4,33	4,82	4,91	4,16	5,53	5,40	3,83	0,59-1,03	4,71	0,63
		C13	4,13	5,32	5,75	3,88	5,82	5,67	6,24	0,79-1,61	5,26	0,90
		N ^{ε2}	4,35	5,31	5,69	4,07	5,61	5,60	6,20	0,75-1,59	5,26	0,77
Ile90		O4	4,76	4,05	3,94	4,03	4,17	4,41	4,41	0,49-0,72	4,25	0,29
		C8	3,88	3,90	3,86	3,94	3,94	3,93	3,97	0,29-0,46	3,92*	0,04
		O3	3,82	3,77	3,82	3,83	3,81	3,87	3,88	0,38-0,59	3,83*	0,04
		O4	3,86	4,06	3,79	4,02	4,10	3,95	3,99	0,37-0,53	3,97*	0,11
Ile91		C3	4,24	4,25	4,06	4,19	4,26	4,02	4,13	0,38-0,50	4,16	0,10

TABLEAU 5.6 – Valeurs moyennes des distances (Å) de certains contacts formés entre FKBP12 et le ligand **308** dans EI2. Les contacts ont été analysés lorsque les valeurs de distances sont inférieures ou égales à 4 Å dans plus de 50 % des structures d’au moins une simulation. Les domaines de fluctuation (Å) reportés représentent les valeurs minimale et maximale de fluctuation autour de chaque moyenne observées pour l’ensemble des simulations SBD.

Paire d'atomes		EI211EI212EI213EI214EI215EI216EI217domaine de fluctuationsEI2 déviation standard																		
FKBP12	Ligand 308	EI21	EI22	EI23	EI24	EI25	EI26	EI27	EI28	EI29	EI210	EI211	EI212	EI213	EI214	EI215	EI216	EI217	domaine de fluctuations	EI2 déviation standard
Phe46	C ^ζ	5,23	4,76	3,94	3,90	4,06	4,24	4,09	4,02	4,01	4,10	3,93	4,98	4,05	4,08	4,03	4,20	4,07	0,30-0,84	4,22 0,39
	O	3,61	4,83	6,11	6,06	5,51	5,78	5,45	5,73	6,48	6,41	5,99	5,08	5,01	5,07	5,83	5,18	5,58	0,40-1,08	5,51 0,69
Gln53	O	5,69	6,08	3,98	3,77	4,14	4,22	4,01	4,07	3,69	4,36	3,77	4,77	4,56	4,42	3,93	4,68	3,97	0,51-0,94	4,36 0,66
	O	5,87	5,24	4,34	6,04	5,88	5,79	5,94	6,05	5,98	6,45	5,89	5,93	5,68	5,80	6,10	5,74	5,89	0,46-1,11	5,80 0,45
Glu54	C16	3,71	3,63	4,14	3,94	3,71	3,67	3,82	3,70	4,10	4,27	3,96	3,73	3,60	3,70	3,99	3,62	3,79	0,28-0,65	3,83* 0,20
	C15	3,83	4,08	3,67	3,60	3,55	3,53	3,56	3,60	3,60	3,67	3,61	3,55	3,65	3,63	3,60	3,65	3,52	0,23-0,48	3,64* 0,13
Val55	N1	3,80	3,95	4,45	4,50	4,35	4,30	4,38	4,47	4,49	4,45	4,51	3,86	4,32	4,35	4,42	4,25	4,34	0,25-0,50	4,30 0,22
	O3	5,49	5,50	4,09	3,93	4,03	4,05	3,95	4,09	4,12	5,46	3,89	5,18	4,10	3,99	4,21	4,17	4,04	0,41-1,56	4,37 0,60
	O1	3,57	3,57	3,89	3,74	3,63	3,62	3,72	3,60	3,75	4,22	3,72	3,61	3,59	3,59	3,84	3,55	3,75	0,20-0,63	3,70* 0,17
	O	5,97	6,30	4,32	3,99	4,31	4,25	4,10	4,38	4,20	5,92	4,03	5,44	4,55	4,25	4,29	4,61	4,22	0,54-2,10	4,66 0,75
	O3	5,10	5,23	4,29	4,03	4,09	4,02	4,02	4,17	4,22	5,68	4,03	4,93	4,12	3,97	4,28	4,14	4,14	0,42-1,72	4,38 0,52

Paire d'atomes																				EI2	déviaton standard	
FKBP12	Ligand	308	EI21	EI22	EI23	EI24	EI25	EI26	EI27	EI28	EI29	EI210	EI211	EI212	EI213	EI214	EI215	EI216	EI217	domaine de fluctuations		
Val55	O1	3,72	3,67	3,39	3,36	3,30	3,32	3,34	3,31	3,35	3,54	3,36	3,55	3,32	3,30	3,39	3,34	3,35	3,34	0,16-0,39	3,41*	0,13
	O1	4,67	4,47	3,69	3,57	3,59	3,66	3,63	3,58	3,61	3,89	3,58	4,34	3,64	3,63	3,67	3,70	3,64	3,64	0,21-0,68	3,80*	0,35
	O1	5,31	5,10	3,86	3,86	3,96	4,04	3,93	4,01	3,88	3,87	3,91	4,85	4,05	4,01	3,89	4,14	3,93	3,93	0,30-0,80	4,15	0,46
	S4	4,08	3,97	4,54	4,47	4,33	4,45	4,45	4,31	4,44	4,68	4,41	4,37	4,26	4,38	4,48	4,26	4,40	4,40	0,29-0,68	4,37	0,17
Ile56	O1	3,45	3,29	3,66	3,37	3,23	3,24	3,36	3,17	3,42	4,16	3,34	3,49	3,18	3,20	3,57	3,11	3,40	3,40	0,25-0,91	3,39*	0,25
	O2	5,59	5,42	5,03	3,77	3,78	3,78	3,83	3,77	3,91	5,78	3,90	5,13	3,95	3,78	3,91	3,80	3,97	3,97	0,45-2,22	4,30	0,74
	O1	3,54	3,43	4,27	3,89	3,79	3,75	3,88	3,72	4,00	4,94	3,83	3,86	3,71	3,74	4,18	3,62	3,93	3,93	0,26-1,22	3,89*	0,34
Trp59	C ^{ζ3}	5,86	5,55	4,13	4,03	4,16	4,17	4,18	4,06	4,05	4,33	4,05	5,06	4,25	4,19	4,22	4,25	4,12	4,12	0,31-0,92	4,39	0,55
	S4	4,44	4,52	4,34	4,05	4,29	4,33	4,27	4,18	4,23	4,65	4,10	4,21	4,26	4,31	4,40	4,10	4,29	4,29	0,38-0,68	4,29	0,15
Tyr82	O4	5,91	5,95	4,61	4,07	4,17	4,11	4,13	4,04	4,14	4,36	4,18	4,83	4,20	4,08	4,24	4,20	4,27	4,27	0,45-0,99	4,44	0,60
	C18	7,15	6,38	3,70	4,00	3,78	3,79	5,07	4,03	3,77	3,75	4,00	5,46	6,01	3,95	3,94	4,94	3,90	3,90	0,29-1,71	4,57	1,08
	C19	7,88	6,98	3,90	4,64	4,27	4,30	5,56	4,69	4,27	4,16	4,56	6,20	6,46	4,53	4,47	5,64	4,38	4,38	0,43-1,89	5,11	1,15
	O2	4,08	3,67	3,83	3,66	3,57	3,59	3,58	3,52	3,68	4,81	3,62	4,41	3,52	3,57	3,61	3,50	3,60	3,60	0,26-1,28	3,75*	0,36
	O2	4,90	4,47	3,87	3,68	3,65	3,67	3,63	3,60	3,69	4,83	3,68	4,23	3,61	3,63	3,66	3,58	3,65	3,65	0,19-1,25	3,88*	0,44
	C18	6,19	5,33	3,73	4,05	3,83	3,89	5,03	4,07	3,81	3,89	4,06	5,44	5,72	3,97	3,96	4,74	3,96	3,96	0,26-1,59	4,45	0,79
	C19	6,96	6,02	3,76	4,54	4,15	4,24	5,38	4,59	4,13	4,14	4,49	6,02	6,07	4,39	4,34	5,28	4,30	4,30	0,40-1,79	4,87	0,91

Paire d'atomes																						
FKBP12	Ligand	308	EI21	EI22	EI23	EI24	EI25	EI26	EI27	EI28	EI29	EI210	EI211	EI212	EI213	EI214	EI215	EI216	EI217	domaine de fluctuations	EI2	déviati standard
Tyr82	O2	4,90	4,54	3,12	2,88	2,89	2,91	2,87	2,86	2,89	3,97	2,90	3,26	2,85	2,87	2,88	2,88	2,88	2,90	0,17-1,16	3,20*	0,64
	C30	5,76	5,35	3,58	3,71	3,72	3,75	3,69	3,73	3,67	3,98	3,69	4,06	3,71	3,72	3,72	3,72	3,76	3,70	0,17-0,74	3,96*	0,62
	C15	6,05	5,74	4,05	4,05	4,07	4,08	4,03	4,09	3,99	4,19	4,04	4,46	4,12	4,08	4,08	4,16	4,06	0,20-0,68	4,31	0,61	
	N1	5,10	4,91	3,40	3,35	3,33	3,33	3,32	3,37	3,29	3,52	3,36	3,83	3,42	3,35	3,38	3,46	3,35	0,23-0,68	3,59*	0,55	
	C1	4,36	4,42	3,36	3,42	3,36	3,42	3,39	3,44	3,36	3,49	3,44	3,52	3,43	3,40	3,42	3,48	3,40	0,19-0,49	3,54*	0,33	
	O1	4,59	4,77	3,82	3,98	3,92	4,02	3,96	4,03	3,93	3,95	4,00	3,71	3,97	3,99	3,98	4,05	3,95	0,27-0,57	4,04	0,26	
	C2	3,73	3,91	3,47	3,52	3,41	3,45	3,48	3,48	3,44	3,59	3,54	3,63	3,46	3,45	3,48	3,48	3,48	0,17-0,46	3,53*	0,13	
	C3	3,83	4,33	4,69	4,76	4,66	4,72	4,74	4,75	4,66	4,72	4,79	4,31	4,68	4,72	4,69	4,63	4,73	0,22-0,73	4,61	0,24	
	N7	4,72	4,75	4,05	4,06	3,94	3,94	4,00	3,97	4,00	4,25	4,08	4,58	4,01	3,95	4,06	4,06	4,01	0,26-0,71	4,14	0,27	
	O4	3,73	3,69	4,31	3,96	3,98	3,94	3,97	3,88	4,00	4,28	4,00	4,60	3,88	3,90	3,97	3,80	4,04	0,39-0,86	4,00	0,22	
	C17	5,13	4,93	3,67	4,06	3,72	3,73	3,95	3,97	3,79	4,09	4,01	4,97	3,93	3,83	3,94	4,08	3,88	0,27-1,25	4,10	0,46	
	C18	5,05	4,31	3,45	3,47	3,35	3,39	4,30	3,46	3,40	3,60	3,46	4,65	4,69	3,42	3,44	3,93	3,46	0,24-1,38	3,81*	0,56	
	C19	5,94	5,20	3,75	4,09	3,84	3,89	4,79	4,10	3,89	4,07	4,03	5,27	5,14	3,98	4,00	4,56	3,98	0,33-1,49	4,39	0,65	
	C22	6,00	6,21	4,15	5,07	4,48	4,49	4,02	4,96	4,57	4,90	4,95	5,82	3,59	4,67	4,85	4,73	4,69	0,45-1,38	4,83	0,68	
His87	O4	4,95	4,94	4,30	3,75	4,22	4,28	4,09	4,02	3,90	3,95	4,09	4,13	4,08	4,04	3,89	4,29	4,07	0,38-0,86	4,18	0,33	
	C17	5,09	4,83	4,66	3,94	4,84	4,70	4,32	4,36	4,31	4,00	4,28	5,38	5,12	4,58	4,27	5,21	4,51	0,37-0,78	4,61	0,42	

Paire d'atomes																					EI2	déviaton standard
FKBP12	Ligand	308	EI21	EI22	EI23	EI24	EI25	EI26	EI27	EI28	EI29	EI210	EI211	EI212	EI213	EI214	EI215	EI216	EI217	domaine de fluctuations		
His87	C ^β	C18	4,43	4,00	4,28	3,76	4,52	4,33	4,57	4,06	4,01	3,82	4,01	5,09	5,96	4,24	3,99	5,10	4,16	0,34-1,00	4,37	0,56
		C19	4,57	4,02	4,99	4,40	5,27	5,03	5,12	4,70	4,76	4,45	4,59	5,94	6,68	4,98	4,70	5,86	4,85	0,45-1,06	4,99	0,65
		O4	5,84	5,14	4,51	4,40	4,35	4,47	4,39	4,55	4,46	4,59	4,53	4,05	4,04	4,34	4,36	4,31	4,31	0,39-1,01	4,51	0,42
		O5	7,40	6,43	4,16	4,15	4,23	4,30	4,31	4,47	4,15	4,01	4,38	5,13	4,30	4,35	4,20	4,89	4,23	0,43-0,98	4,65	0,91
		C17	5,36	4,87	4,12	4,40	4,17	4,05	4,19	4,47	4,54	4,47	4,27	4,65	4,32	4,29	4,42	4,49	4,15	0,34-0,80	4,43	0,32
N ^{δ1}		C18	4,60	4,31	3,91	4,58	3,95	3,77	4,35	4,43	4,51	4,63	4,26	4,29	4,98	4,10	4,43	4,34	4,02	0,37-0,92	4,32	0,30
		S8	6,91	6,14	4,19	4,94	4,14	3,95	4,43	4,86	4,91	4,94	4,65	4,72	4,16	4,45	4,81	4,57	4,31	0,35-1,26	4,77	0,74
		O4	6,53	5,67	4,50	4,96	4,31	4,30	4,52	4,90	4,89	5,07	4,77	4,31	4,06	4,52	4,77	4,35	4,44	0,46-1,31	4,76	0,60
		O5	7,97	6,76	3,74	4,46	3,86	3,49	4,09	4,50	4,39	4,28	4,27	5,03	4,09	4,14	4,40	4,73	3,95	0,43-1,44	4,60	1,12
		C17	5,82	5,35	3,91	4,94	3,78	3,64	4,24	4,66	5,01	5,04	4,44	4,47	3,91	4,21	4,81	4,19	4,10	0,32-1,07	4,50	0,60
C ^{δ2}		C18	5,03	4,89	3,96	5,23	3,74	3,79	4,53	4,76	5,09	5,33	4,62	4,17	4,51	4,22	4,92	4,16	4,22	0,40-1,08	4,54	0,50
		C22	6,11	5,68	4,39	5,25	4,31	4,06	4,52	5,03	5,60	5,39	4,74	5,18	3,86	4,73	5,31	4,59	4,55	0,44-1,29	4,90	0,61
		C18	4,90	4,60	4,12	5,20	4,21	3,91	4,57	4,95	4,93	5,20	4,69	4,19	4,87	4,44	4,89	4,33	4,31	0,57-1,13	4,61	0,39
		C19	4,47	4,61	4,32	5,75	4,50	3,93	4,87	5,33	5,45	5,70	4,95	4,66	5,31	4,78	5,41	4,60	4,61	0,64-1,28	4,90	0,51
		O5	8,65	6,90	4,12	4,84	4,14	4,04	4,46	4,92	4,76	4,72	4,68	5,35	4,23	4,55	4,73	5,07	4,26	0,51-1,45	4,97	1,16
C ^{ε1}	C17	6,36	5,75	4,04	5,64	3,82	3,74	4,64	5,19	5,51	5,72	4,88	4,36	3,79	4,49	5,30	4,13	4,34	0,32-1,25	4,81	0,81	

Paire d'atomes																					EI2	dévi- standard
FKBP12	Ligand	308	EI21	EI22	EI23	EI24	EI25	EI26	EI27	EI28	EI29	EI210	EI211	EI212	EI213	EI214	EI215	EI216	EI217	domaine de fluctuations		
His87	C ^{ε1}	C18	5,55	5,49	4,21	6,11	3,91	3,92	4,84	5,43	5,75	6,17	5,20	3,99	4,07	4,59	5,57	4,05	4,60	0,39-1,35	4,91	0,80
		C21	5,88	5,77	4,40	6,27	4,17	3,95	5,23	5,63	6,38	6,44	5,22	5,04	4,13	4,99	6,04	4,35	4,79	0,49-1,63	5,22	0,83
		C22	6,49	5,86	4,12	5,73	3,95	3,74	4,84	5,29	5,84	5,86	4,88	4,84	3,81	4,69	5,54	4,25	4,43	0,40-1,43	4,95	0,84
		C18	5,52	5,38	4,34	6,14	4,20	4,02	4,89	5,57	5,71	6,15	5,28	4,01	4,30	4,75	5,61	4,16	4,69	0,45-1,17	4,98	0,74
		C19	4,82	5,32	4,40	6,66	4,31	3,88	5,14	5,85	6,19	6,65	5,46	4,21	4,55	4,93	6,06	4,15	4,88	0,50-1,49	5,14	0,88
		C20	5,01	5,44	4,45	6,71	4,40	3,92	5,35	5,94	6,41	6,72	5,44	4,80	4,63	5,11	6,22	4,35	4,93	0,53-1,70	5,28	0,86
Ile90		C21	5,79	5,58	4,43	6,23	4,39	4,09	5,33	5,73	6,16	6,30	5,20	5,14	4,45	5,11	5,93	4,51	4,79	0,54-1,59	5,24	0,71
	C ^β	O4	4,71	4,75	3,81	4,25	4,03	4,01	4,16	4,14	4,06	3,98	4,20	4,24	4,30	4,11	4,03	4,27	4,02	0,28-0,55	4,18	0,24
	C ^δ	O5	3,97	4,20	3,72	3,74	3,63	3,73	3,78	3,72	3,67	3,68	3,73	3,77	3,70	3,75	3,68	3,81	3,66	0,38-0,72	3,76*	0,14
Ile91		O4	5,77	5,78	3,73	4,36	4,04	3,67	4,12	3,99	4,07	3,87	4,14	4,06	4,37	3,93	3,96	3,89	3,87	0,36-0,69	4,21	0,62
	C ^δ	C3	4,95	4,74	3,71	3,71	3,75	3,73	3,72	3,73	3,74	3,91	3,72	4,65	3,79	3,75	3,78	3,97	3,74	0,23-0,70	3,95*	0,41
	C ^{γ1}	C3	3,89	3,87	4,44	4,36	4,53	4,37	4,37	4,47	4,55	4,64	4,41	4,14	4,55	4,48	4,46	4,65	4,44	0,28-0,61	4,39	0,22

Il est intéressant de noter que parmi toutes les interactions qui présentent des distances moyennes de contact inférieures à 4 Å dans EI1, seulement quatre interactions correspondent à des interactions observées dans SC1 : celles formées par **8**-O2 avec les atomes Val55-(C, C α) et Ile56-(N, C γ^2). Parmi ces interactions se trouve l'interaction permanente Ile56-N...**8**-O2 qui fait intervenir deux des trois atomes intervenant dans la liaison hydrogène Ile56-H...**8**-O2. Afin de savoir si le résidu Ile56 forme une liaison hydrogène avec l'atome **8**-O2 dans EI1, la distance de séparation entre les atomes du couple Ile56-H...**8**-O2 ainsi que l'angle formé entre les atomes Ile56-N, Ile56-H et **8**-O2 ont été calculés pour les simulations SBD de EI1. Les valeurs pour EI1 sont respectivement égales à $3,08 \pm 0,14$ Å et à $95 \pm 8^\circ$. Ces valeurs montrent que la liaison hydrogène Ile56-H...**8**-O2 présente dans EC1 et SC1 n'est pas encore formée de manière permanente dans EI1. Dans le tableau 5.5, le couple d'atomes Tyr82-O η ...**8**-O3 qui contient deux des trois atomes intervenant dans la deuxième liaison hydrogène native ne forme pas d'interaction permanente (distance de contact de $4,48 \pm 0,87$ Å). Même lorsque l'atome Tyr82-H η est pris en compte, le contact Tyr82-H η ...**8**-O3 n'est pas permanent (distance calculée à $4,15 \pm 1,15$ Å dans EI1). Ainsi, lors du passage de EI1 vers EC1, la formation des deux liaisons hydrogènes Ile56-H...**8**-O2 et Tyr82-H η ...**8**-O3 doit représenter un gain enthalpique jouant le rôle d'une force motrice entre ces deux états. Nous voyons donc qu'entre les molécules séparées et EI1, il y a un gain progressif en nombre d'interactions.

Pour EI2, 17 distances intermoléculaires, chacune marquée par un astérisque dans le tableau 5.6, sont inférieures à 4 Å. Deux types de contact sont relevés correspondants pour le premier, dont les valeurs de distances sont en italique dans le tableau 5.6, à des contacts présents dans chacune des simulations (à une ou deux exceptions près) et, pour le deuxième, à des contacts présents dans certaines d'entre elles uniquement, les déviations standards étant plus faibles (inférieures à 0,25 Å) dans le premier type comparées au second. Dans le premier type de contact, nous retrouvons quatre groupes d'interaction permanente : Glu54-O...**308**-C15,C16 / Val55-(C, C α)...**308**-O1 / Ile56-N...**308**-O1 / Tyr82-O η ...**308**-C2 / Ile90-C δ ...**308**-O5. Parmi ces sept contacts permanents avec de faibles déviations standards (valeurs de distances mises en italique dans le tableau 5.6), remarquons que quatre d'entre eux ont leur équivalent dans EI1 : Ile56-N et Val55-(C, C α) avec l'atome **308**-O1 équivalents à ceux formés par l'atome **8**-O2 et Ile90C δ ...**308**-O5 équivalent à Ile90-C γ^2 ...**8**-O3. Un autre contact dans **308**, Glu54-O...**308**-

C15, est retrouvé dans **8** mais avec des variations plus importantes entre simulations SBD1 (distances de $3,64 \pm 0,13$ Å dans EI2 et $3,96 \pm 0,25$ Å pour EI1). Ces résultats montrent donc des contacts entre atomes du ligand et de la protéine qui sont équivalents entre EI1 et EI2, malgré les structures dissemblables pour ces deux ligands. Ils montrent de plus une position globalement équivalente pour ces deux ligands dans ces états intermédiaires.

Contrairement à ce qui est observé pour EI1, presque toutes les interactions permanentes formées dans EI2 sont présentes dans SC2 (14 sur 17 interactions). Les trois interactions uniquement présentes dans EI2 sont Tyr82-O^{*η*}...**308**-C18, Ile90-C^{*δ*}...**308**-O5 et Ile91-C^{*δ*}...**308**-C3. Parmi les interactions permanentes formées dans EI2 et présentes dans également dans SC2, se trouvent les interactions Ile56-N...**308**-O1 ($3,39 \pm 0,25$ Å) et Tyr82-O^{*η*}...**308**-O2 ($3,20 \pm 0,64$ Å) qui contiennent deux des trois atomes impliqués dans les deux liaisons hydrogènes formées dans SC2 (Ile56-H...**308**-O1 et Tyr82-H^{*η*}...**308**-O2). Afin de savoir si les résidus Ile56 et Tyr82 forment une liaison hydrogène avec les atomes respectifs **308**-O1 et **308**-O2, les distances de séparation entre les atomes des couples Ile56-H...**308**-O1 et Tyr82-H^{*η*}...**308**-O2 ainsi que les angles formés, d'une part, entre les atomes Ile56-N, Ile56-H et **308**-O1 et, d'autre part, entre les atomes Tyr82-O^{*η*}, Tyr82-H^{*η*} et **308**-O3 ont été calculés pour les simulations SBD de EI2. Les valeurs sont $2,78 \pm 0,34$ Å / $123 \pm 12^\circ$ et $2,52 \pm 1,13$ Å / $140 \pm 40^\circ$ respectivement pour les interactions Ile56-H...**308**-O1 et Tyr82-H^{*η*}...**308**-O2. Ces valeurs indiquent que les deux liaisons hydrogènes natives ne sont pas encore formée de manière permanente dans EI2. Toutefois, il est important de noter que pour 13 des 17 simulations, la liaison hydrogène Tyr82-H^{*η*}...**308**-O2 est formée de manière quasi-permanente. Ainsi, comme pour le complexe FKBP12-**8**, la formation de la liaison hydrogène Ile56-H...**308**-O1 représente un gain enthalpique lors du passage de EI2 vers EC2.

D'après les résultats précédents, il est possible de conclure que peu d'interactions permanentes sont formées dans EI, en particulier dans EI1. Il est donc difficile à partir de cette analyse et des résultats de RMSF indiquant la mobilité élevée des parties du ligand de comprendre l'origine de la stabilité des EI, notamment en ce qui concerne la position stable du ligand dans le site de fixation. Ainsi, il est nécessaire d'analyser les interactions transitoires qui peuvent se former entre un résidu et une partie du ligand et contribue à la stabilité du ligand.

3.4.2. Analyse des interactions transitoires

Afin de quantifier les contacts transitoires formés entre le ligand et FKBP12, la même procédure que celle utilisée pour EC dans la sous-section 2.2.2. p. 107 a été utilisée. Les valeurs moyennes du nombre d'interactions formées entre FKBP12 et le ligand dans EI sont présentées sous forme de carte sur la figure 5.6. Comme pour EC, le nombre d'interactions transitoires formées entre une partie du ligand et un résidu de FKBP12 peut s'obtenir à partir de la carte du nombre total d'interactions en y retranchant le nombre d'interactions permanentes formées entre ces deux groupes d'atomes.

Sur la carte pour EI1, les deux groupes d'interactions permanentes détaillés précédemment sont visibles : les résidus Val55/Ile56 en interaction avec la sous-partie O1C1O2 de **8**, dans laquelle l'atome **8**-O2 forme la majorité des contacts, et le résidu Ile90 en interaction avec les deux sous-parties C8O3 et C9O4 où l'atome **8**-O4 est responsable des contacts permanents tandis que l'atome **8**-C9 intervient dans des contacts transitoires (toutes les fréquences de contact entre ce dernier et le résidu Ile90 sont très inférieures à 50 %). Environ deux interactions transitoires ($\pm 0,6$) sont trouvées entre la sous-partie C8O3 et le résidu Tyr82 du fait de contacts transitoires entre les atomes **8**-O3 et Tyr82-(O $^\eta$, C $^\zeta$, C e2). Cependant, dans les simulations EI13 et EI16 uniquement, une interaction de van der Waals permanente est formée entre Tyr82-O $^\eta$ et **8**-O3 (tableau 5.6).

Le résultat frappant de la figure 5.6 est l'apparition d'autres groupes d'atomes participant à la formation de nombreuses interactions intermoléculaires supplémentaires. Pour EI1, ces interactions sont les suivantes : la partie Ph1 de **8** forme deux (± 1) et près de six ($\pm 1,2$) interactions avec respectivement les résidus Gln53 et Tyr82 ; la partie Ph2 de **8** forme deux ($\pm 0,6$) et environ trois ($\pm 0,6$) interactions avec respectivement les résidus Gln53 et Glu54 ; et la partie *i*Pe de **8** forme quatre ($\pm 0,4$) interactions avec le résidu His87. Pour mieux caractériser ces interactions, il est nécessaire d'identifier précisément les partenaires atomiques, la nature de ces interactions et les processus permettant leur formation. Comme décrit précédemment dans le tableau 5.6, l'ensemble des distances séparant les atomes des parties Ph1, Ph2 et *i*Pe de **8** de ceux des résidus Gln53, Glu54, Tyr82 et His87 sont supérieures à 4 Å (sauf pour le couple Glu54-O \cdots **8**-C25). Les valeurs élevées de déviations standards observés pour ces distances sont liées à la mobilité importante (RMSF élevés) des atomes des chaînes latérales des résidus Gln53, Tyr82

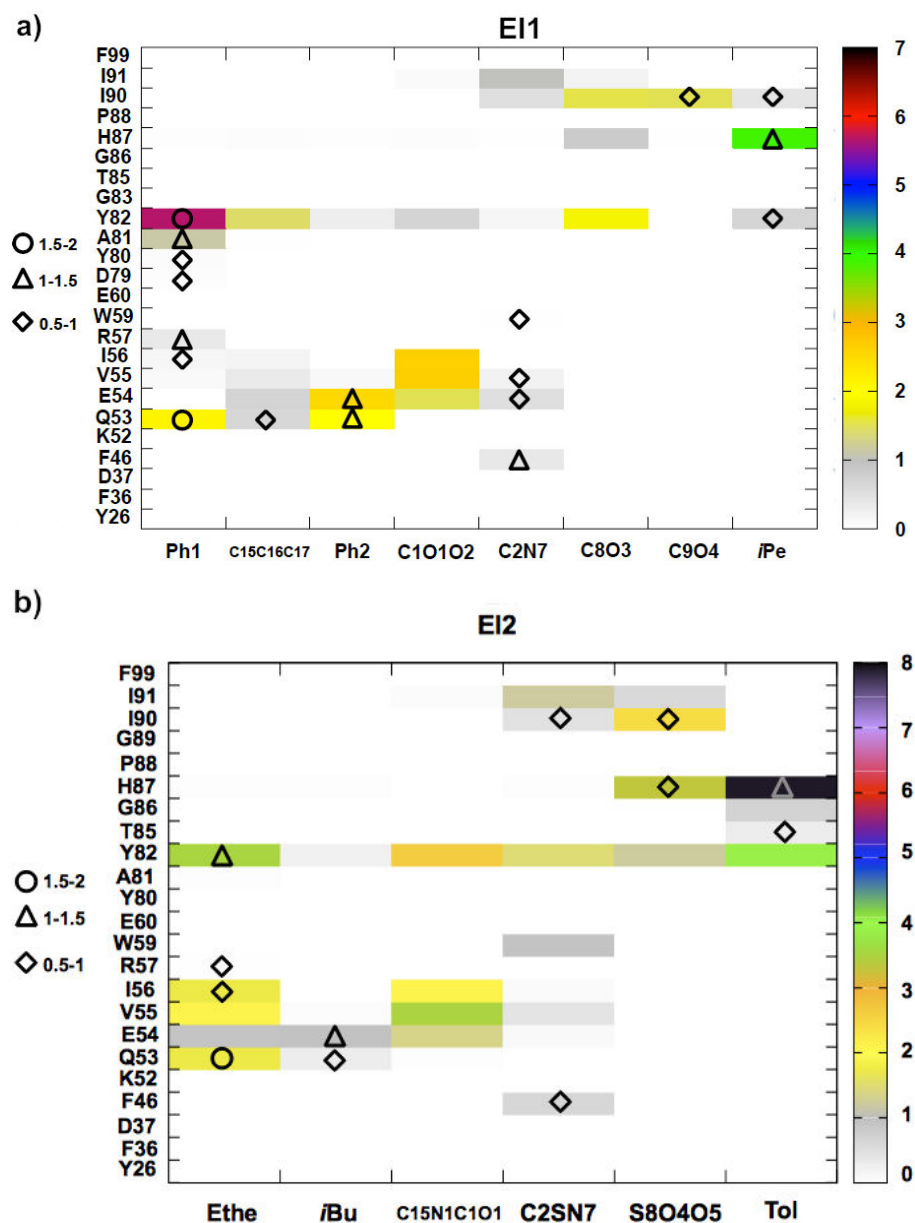


FIGURE 5.6 — Nombre moyen d'interactions (code couleur fourni à droite des cartes) formées entre chaque paire de groupes d'atomes de FKBP12 et (a) du ligand **8** dans EI1 et (b) du ligand **308** dans EI2. Chaque paire de groupes d'atomes est composée d'une partie du ligand et d'un résidu de la protéine. Le nombre moyen de molécules d'eau en contact avec en même temps une partie du ligand et un résidu de la protéine est également représenté (les rond, triangle et cercle correspondent respectivement à des nombres moyens de molécule d'eau reliant les deux partenaires compris dans les intervalles $[0,5; 1]$, $[1; 1,5]$ et $[1,5; 2]$). La partie de cœur de **8** a été sous-divisée en deux groupements cétone (C8O3 et C9O4), un cycle pipécolinyle (C2N7) et une fonction ester (O1C1O2); C17C16C15 correspond au "bras" propyl. La partie de cœur de **308** a été sous-divisée en une fonction amide (N1C1O1), un cycle thiazane (C2SN7) et un groupement sulfonyle (S8O4O5). Tous les types de contacts (distance séparant les atomes d'au plus 4 Å) ont d'abord été calculés pour chaque simulation SBD de EI; la valeur moyenne reportée ici a ensuite été dérivée à partir des simulations indépendantes du même EI.

et His87 ainsi que des parties Ph1, Ph2 et *i*Pe de **8** (voir figure 5.5). La mobilité importante des parties Ph1, Ph2 et *i*Pe est due aux faibles barrières énergétiques associées aux rotations autour des liaisons covalentes respectives C18-C17, C24-C15 et C9-C10 (barrières énergétiques respectives de 0,5, 1,6 et 1,4 kcal/mol ; figure 3.10 p. 67). La rotation aisée de la partie Ph2 permet d'échanger facilement les segments C25-C26 et C29-C28 afin de former des interactions transitoires de même nature avec les atomes d'oxygène du squelette des résidus Gln53 et Glu54 : ces interactions transitoires correspondent à deux interactions de type $\text{CH} \cdots \text{O}$ formées entre chacun de ces résidus et tantôt le segment C25-C26 et tantôt le segment C29-C28 de Ph2 et chacun de ces deux résidus (figure 5.7 (a)). Pour la partie *i*Pe de **8**, une pseudo-symétrie d'ordre 3 peut être observée lors de la rotation autour de la liaison covalente C9-C10. De manière similaire, les atomes **8**-C11, **8**-C13 et **8**-C14 peuvent échanger leurs positions afin de former chacun des interactions transitoires avec le cycle imidazole du résidu His87 (figure 5.7 (b)). Chacun des atomes **8**-C11, **8**-C13 et **8**-C14 de la partie *i*Pe forme quatre interactions de type $\text{CH} \cdots \pi$ avec les atomes du cycle imidazole du résidu His87. Ainsi, alors même que les distances associées aux atomes précédents sont supérieures à 4 Å lorsqu'elles sont calculées individuellement, cette analyse montre qu'il existe, à chaque instant, des contacts entre la protéine et un atome de *i*Pe et, dans le cas des résidus Gln53 et Glu54, deux atomes de Ph2.

Comparativement aux parties *i*Pe et Ph2 de **8**, pour lesquelles un total d'environ cinq interactions sont identifiées pour chaque partie, un nombre total légèrement plus élevé d'interactions transitoires est formé entre la partie Ph1 de **8** et la fonction amide de la chaîne latérale du résidu Gln53, le cycle aromatique du résidu Tyr82 et la chaîne latérale du résidu Ala81 (respectivement environ deux (± 1), six ($\pm 1,2$) et une ($\pm 0,3$) interactions). Les distances instantanées entre les centres des cycles aromatiques de la partie Ph1 et du résidu Tyr82 ainsi que celles entre le centre du cycle aromatique Ph1 et chacun des atomes N^ϵ et O^ϵ du résidu Gln53 sont reportées sur la figure 5.7 (c). À cause de la mobilité élevée des partenaires d'interaction, des interactions de très courtes durée de vie sont observées durant les simulations (la partie Ph1 du fait de la grande flexibilité du bras propyle C17-C16-C15 et les chaînes latérales des résidus Gln53 et Tyr82). Afin d'obtenir une analyse quantitative des interactions entre ces trois groupements, les valeurs des trois distances, présentées sur la figure 5.7 (c) et obtenues à partir d'une simulation SBD donnée, ont été regroupées par valeurs discrètes correspondant à des intervalles séparés de

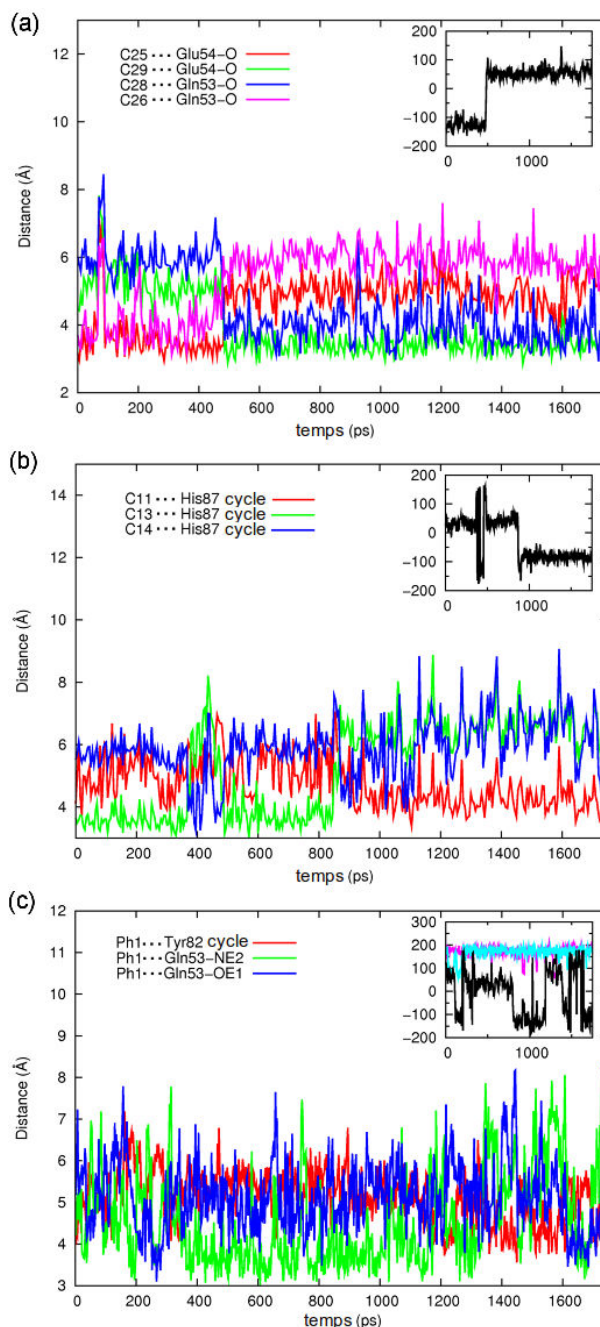


FIGURE 5.7 — Suivi des distances séparant les parties périphériques de **8** et quelques atomes de la protéine au cours des simulations SBD de EI1. (a) Distances séparant les atomes **8**-C25, **8**-C26, **8**-C28 et **8**-C29 du cycle Ph2 et les atomes d'oxygène du squelette des résidus Gln53 et Glu54. L'encart représente l'évolution de l'angle de rotation autour de la liaison covalente C24-C15. (b) Distances séparant les atomes de la partie *i*Pe du centre du noyau imidazole du résidu His87. L'encart représente l'évolution de l'angle de rotation autour la liaison covalente C9-C10. (c) Distance séparant le centre du cyle Ph1 de celui du cycle aromatique de la chaîne latérale du résidu Tyr82, et distances séparant le centre du cycle Ph1 et les deux atomes N^{ε2} et O^{ε1} de la chaîne latérale du résidu Gln53. L'encart représente les évolutions des angles de rotation autour des liaisons covalentes C16-C15 (violet), C17-C16 (cyan) et C18-C17 (noir).

0,25 Å. La même procédure a été suivie pour chaque simulation SBD de EI1 puis les valeurs moyennes ont été calculées pour EI1 afin d'obtenir l'histogramme présenté sur la figure 5.8 p. 172. Entre les centres des cycles aromatiques de la partie Ph1 et du résidu Tyr82, les intervalles de distance de séparation les plus peuplés sont trouvés dans le domaine 4-5,5 Å, un domaine de distance qui indique des interactions de type π - π possibles puisque les distances optimales d'interaction calculées pour deux cycles benzène sont soit comprises entre 3,75 et 4,02 Å pour une orientation parallèle décalée, soit égales à 4,96 Å pour une orientation en forme de T [120]. Concernant les distances séparant les atomes Gln53-N^ε ou -O^ε et le centre du cycle aromatique Ph1, les interactions de type NH... π formées avec l'atome N^ε semblent prédominantes étant donné le nombre de contacts plus importants formés à de courtes distances dans l'intervalle 3-4 Å. Une inspection visuelle des trajectoires a permis de confirmer la prépondérance de ces deux types d'interaction (π - π et NH... π). Elle a également permis de voir que, contrairement aux interactions π - π formées entre la partie Ph1 et le résidu Tyr82 qui présentent principalement deux orientations, aucune orientation n'est favorisée dans l'interaction entre la fonction amide du résidu Gln53 et la partie Ph1. Les orientations observées sont celles pour lesquelles soit la fonction amide est cofaciale avec le cycle aromatique, soit un des atomes d'hydrogène de la fonction amide pointe vers une des faces du cycle aromatique, soit la liaison NH pointe vers un segment covalent du cycle, coplanaire avec le cycle [120].

Sur la carte pour EI2, les 17 interactions permanentes détaillées dans la sous-section précédente sont visibles : le résidu Glu54 en interaction avec les sous-parties C15N1C1O1 et *i*Bu de **308** pour lesquelles les atomes **308**-C15 et **308**-C16 respectivement forment l'interaction principale ; les résidus Val55/Ile56 en interaction avec la sous-partie C15N1C1O1, où l'atome **308**-O1 forme la majorité des contacts ; le résidu Tyr82 avec la partie Ethe et les sous-parties C15N1C1O1 et C2SN7, où les atomes **308**-(O2, C30, C1, C2) sont responsables des contacts permanents tandis que les atomes **308**-(O1, C3, N7) interviennent dans des contacts transitoires avec Tyr82 étant donné que les distances de contact sont supérieures à 4 Å dans la plupart des simulations SBD de EI2 ; et le résidu Ile90 en interaction avec la sous-partie S8O4O5, où l'atome **308**-O5 est responsable d'un contact permanent tandis que l'atome **308**-O4 intervient dans un contact transitoire (distance calculée respectivement inférieure et supérieure à 4 Å dans le tableau 5.6). La sous-partie C2SN7 de **308** intervient également dans une autre interaction

transitoire formée avec le résidu Trp59^f. La sous-partie S8O4O5 participe aussi à quatre interactions transitoires : une formée avec le résidu Tyr82 et trois avec le résidu His87.

Sur la carte de la figure 5.6 pour EI2, des nombres d'interaction élevés apparaissent pour les parties périphériques : la partie Ethe de **308** forme environ deux ($\pm 0,6$), une ($\pm 0,6$), deux (± 1) et deux ($\pm 0,7$) interactions avec respectivement les résidus Gln53, Glu54, Val55 et Ile56 ; la partie *i*Bu intervient dans une ($\pm 0,4$) interaction avec le résidu Glu54 ; et la partie Tol forme quatre (± 2) et huit (± 3) interactions avec respectivement les résidus Tyr82 et His87.

Une autre partie des interactions transitoires qui intervient dans la stabilisation de la position du ligand dans le site de fixation de FKBP12 et par conséquent de EI regroupe les ponts formés par les molécules d'eau entre FKBP12 et le ligand. En plus du nombre d'interactions formées directement entre une partie du ligand et un résidu de FKBP12, la figure 5.6 contient également les informations sur le nombre moyen de molécules d'eau présentes en même temps en contact avec un résidu de FKBP12 et une partie du ligand dans EI.

Dans EI1, les molécules d'eau forment principalement des contacts en même temps avec un résidu de la protéine et avec une des (sous-)parties suivantes de **8** : Ph1, Ph2 et *i*Pe ainsi que la sous-partie C2N7. En revanche, aucune molécule d'eau n'est trouvée en contact en même temps avec les sous-parties polaires O1C1O2 et C8O3 de **8** et un des résidus de FKBP12. Toutefois, il est possible de trouver des molécules d'eau qui forment des liaisons hydrogènes avec l'atome **8-O4** (fréquence moyenne de contact de 86 % avec en moyenne une molécule d'eau). Le nombre moyen de molécules d'eau présentes en contact en même temps soit avec la partie *i*Pe et le résidu His87, soit avec la partie Ph2 et le résidu Gln53, soit avec la partie *i*Pe et le résidu Glu54 est compris dans l'intervalle 1-1,5. Bien que la partie C2N7, comparativement aux autres parties du

^f. Il est intéressant de noter que, dans le tableau 5.6, certaines distances supérieures à 4 Å, mais proches de cette valeur, correspondent à des contacts transitoires. Toutefois, le nombre plus faible d'interactions transitoires entre deux groupes d'atomes G1 du ligand et G2 de FKBP12 sur la carte 5.6 par rapport au nombre de contacts transitoires du tableau 5.6 formés entre atomes de ces mêmes groupes G1 et G2 montre que plusieurs contacts transitoires peuvent contribuer à un seul contact repéré sur la carte 5.6. Par exemple, dans le tableau 5.6 deux contacts transitoires sont formés entre la sous-partie C2SN7 et le résidu Trp59 (Trp59-C^{ζ3}...**308**-(C3, S4)) alors que sur la carte 5.6 une seule interaction transitoire est observée entre ces deux groupes d'atomes. Ceci montre que les échanges entre les deux contacts transitoires permettent en moyenne de former une interaction repérée sur la carte.

ligand discutées, ne forme pas en moyenne beaucoup plus de contact avec des molécules d'eau qui sont en même temps en contact avec la protéine, la molécule d'eau en moyenne trouvée dans ce cas interagit avec plus de résidus de FKBP12 (pour chacun des résidus Phe46, Glu54, Val55 et Trp59, en moyenne une molécule d'eau est en contact avec ce résidu et C2N7). Ce résultat, qui implique trois résidus du fond de la cavité principale du site de fixation (Phe46, Val55 et Trp59; voir aussi figure 4.1 p. 91) où vient se loger la sous-partie C2N7 dans EC1, indique qu'une couche d'eau est présente à l'interface entre le ligand et la protéine dans EI1. Enfin, légèrement plus de molécules d'eau font la jonction entre la partie Ph1 et la protéine (environ deux pour la jonction avec chacun des résidus Gln53 et Tyr82, et 0,5 à 1,5 pour celle avec les résidus Ile56, Arg57, Asp79, Tyr80 et Ala81).

Pour EI2, les molécules d'eau forment principalement des contacts en même temps avec un résidu de la protéine et avec toutes les (sous)-parties de **308**, sauf avec la sous-partie C15N1C1O1. Comme pour EI1, la sous-partie polaire S8O4O5 de **308**, qui est l'équivalent des sous-parties C8O3 et C9O4 de **8**, interagit avec environ une molécule d'eau, celle-ci interagissant en même temps avec les résidus His87 et Ile90. De plus, l'atome **308-O5** forme une liaison hydrogène avec au moins une molécule d'eau qui présente des fréquences de contact supérieures à 60 % dans toutes les simulations. Le nombre moyen de molécules d'eau présentes en contact en même temps soit avec la partie Ethe et Tyr82, soit avec la partie *i*Bu et le résidu Glu54, soit avec la partie Tol et le résidu His87 est compris dans l'intervalle 1-1,5. Contrairement, à ce qui est observé pour le cycle C2N7 de **8** dans EI1, très peu de molécule d'eau sont retrouvées en contact avec le cycle C2SN7 et en même temps la protéine (seulement 0,5 et 0,6 avec les résidus Ile90 et Phe46), ce qui peut être la conséquence de la présence de l'atome de soufre **308-S4** beaucoup plus volumineux que l'atome **8-C4** correspondant dans EI1. Enfin, comme pour la partie Ph1 de **8** dans EI1, légèrement plus de molécules d'eau font la jonction entre la partie Ethe et FKBP12. Le nombre moyen de molécules d'eau présentes en contact en même temps avec Ethe et le résidu Glu54 est compris dans l'intervalle 1,5-2.

3.4.3. Analyse des orbitales moléculaires

Afin de compléter les informations sur la nature des interactions formées entre FKBP12 et le ligand **8** dans EI1, des calculs semi-empiriques d'orbitales moléculaires ont été effectués

avec l'hamiltonien PM5 du programme MOZYME disponible dans la version commerciale de MOPAC (MOPAC2006) [61] (section 2. p. 23) sur des structures tirées des simulations SBD de cet état. Cette approche semi-empirique a permis d'obtenir des valeurs d'enthalpies de complexation pour des systèmes protéine-ligand proches de celles expérimentales [121]. Les calculs sur EI1 ont mis en évidence la présence d'une interaction de type électronique à courte distance entre les cycles aromatiques Ph1 de **8** et de la chaîne latérale du résidu Tyr82. Cette interaction, présentée sur la figure 5.9 p. 173, correspond à un recouvrement des orbitales moléculaires de type π de chacun des deux cycles aromatiques. Cette interaction électronique de type π - π survient lorsque les deux cycles aromatiques sont orientés parallèlement sans que leurs centres ne soient alignés (configuration appelée parallèle décalée ; voir figure 5.10 p. 173). À notre connaissance, comme indiqué par Olivieri et Gardebien [38], ce résultat est le premier démontrant clairement la présence d'interactions électroniques à courte distance (recouvrements orbitales) lors de l'étape de reconnaissance entre une protéine et son ligand.

3.4.4. Résumé des interactions formées dans les EI

Les nombres d'interaction formée entre FKBP12 et le ligand dans les états intermédiaires, leur caractère permanent ou transitoire ainsi que leur type sont résumés sur la figure 5.11 p. 174.

En comparant les interactions intermoléculaires formées dans EI avec celles formées dans EC (figure 4.8 p. 118), il ressort que la partie de cœur du ligand qui forme le plus d'interactions dans EC est celle qui forme le moins d'interactions dans EI, ceci est spécialement vrai pour les sous-parties C2N7 de **8** et C2SN7 de **308** (16 et 15 interactions respectivement dans EC1 et EC2 contre une et deux interactions respectivement dans EI1 et EI2). Dans EI1, les parties Ph2 et *i*Pe forment le même nombre d'interactions (cinq interactions chacun) tandis que la partie Ph1 intervient dans un nombre plus élevé d'interaction (neuf). Comparativement, dans EC1, la partie Ph2 forme moins d'interaction (une) tandis que la partie Ph1 en forme moins (5) et la partie *i*Pe en forme plus (10). D'après cette comparaison, il semblerait qu'une partie des interactions formées par les parties Ph1 et *i*Pe dans EI1 soit perdues et compensées par des interactions formées par *i*Pe dans EC1 lors du passage de EI1 vers EC1. Dans EI2, la partie *i*Bu de **308** ne forme qu'une seule interaction tandis que les parties Ethe et Tol interviennent dans un nombre très élevé d'interaction (onze chacune). Comparativement, dans EC2, la partie *i*Bu

forme toujours une interaction tandis que la partie Ethe en forme légèrement moins (huit) et la partie Tol en forme plus (16). D'après cette comparaison, lors du passage de EI2 vers EC2, tout se passe comme si les interactions formées par Ethe dans EI2 et perdues en partie dans EC2 étaient compensées par des interactions formées par Tol.

Afin de compléter les analyses des interactions entre FKBP12 et le ligand dans EI, les énergies d'interaction ont été calculées pour chaque couple résidu-partie périphérique du ligand qui présente des nombres élevés d'interactions sur la figure 5.11^g. Ces valeurs proviennent de moyennes d'ensemble réalisées sur l'ensemble des simulations SBD de EI1 et EI2. Elles sont présentées dans les tableaux 5.7 et 5.8 pp. 175-176. Pour EI1, les valeurs d'énergie d'interaction révèlent que l'interaction de plus basse énergie est formée entre la partie Ph1 et le résidu Tyr82 (énergie de -2,8 kcal/mol). Des énergies similaires comprises entre -1,1 et -1,4 kcal/mol sont retrouvées pour les interactions Ph1...Gln53, Ph2...Gln53 et *i*Pe...His87. Les interactions Ph2...Glu54 et *i*Pe...Tyr82 présentent des énergies moins importantes comprises entre -0,6 et -0,7 kcal/mol.

Pour EI2, contrairement à ce que laisserait supposer le nombre élevé d'interactions entre la partie Tol et le résidu His87 sur la carte d'interaction, l'énergie d'interaction globale pour ce couple n'est pas la plus basse formée par les parties périphériques du ligand **308**. En effet, l'énergie totale associée à ces interactions est égale à -1,8 ($\pm 0,2$) kcal/mol, alors que pour les interactions Ethe...Tyr82 l'énergie totale associée est -3,3 (± 1) kcal/mol. Cette valeur d'énergie plus basse pour les interactions Ethe...Tyr82 est vraisemblablement due à la liaison hydrogène quasiment formée Tyr82-O ^{η} ...**308**-O2 (formée dans 13 sur 17 simulations). De plus, les interactions formées par Ethe avec les résidus Gln53, Val55 et Ile56 donnent des énergies totales comprises entre -1,08 et -1,85 ($\pm 0,3-0,4$) kcal/mol. La somme des contributions partie-résidu vaut -7,97 et -9,67 kcal/mol pour, respectivement, **8** et **308**. Il est intéressant de constater que ces valeurs sont très proches.

Comme pour les autres analyses effectuées sur les EI, les résultats des interactions formées entre FKBP12 et le ligand montrent des similitudes entre les états EI1 et EI2. Dans le chapitre

g. Pour les interactions avec la protéine, les contributions électrostatiques à longue distance peuvent provenir d'interactions avec tous les résidus de FKBP12, même très distants, et ne peuvent être considérées comme fiable à cause de l'absence de la prise en compte des effets du solvant sur les interactions.

suivant, les caractéristiques structurales et les interactions communes aux deux EI sont discutées.

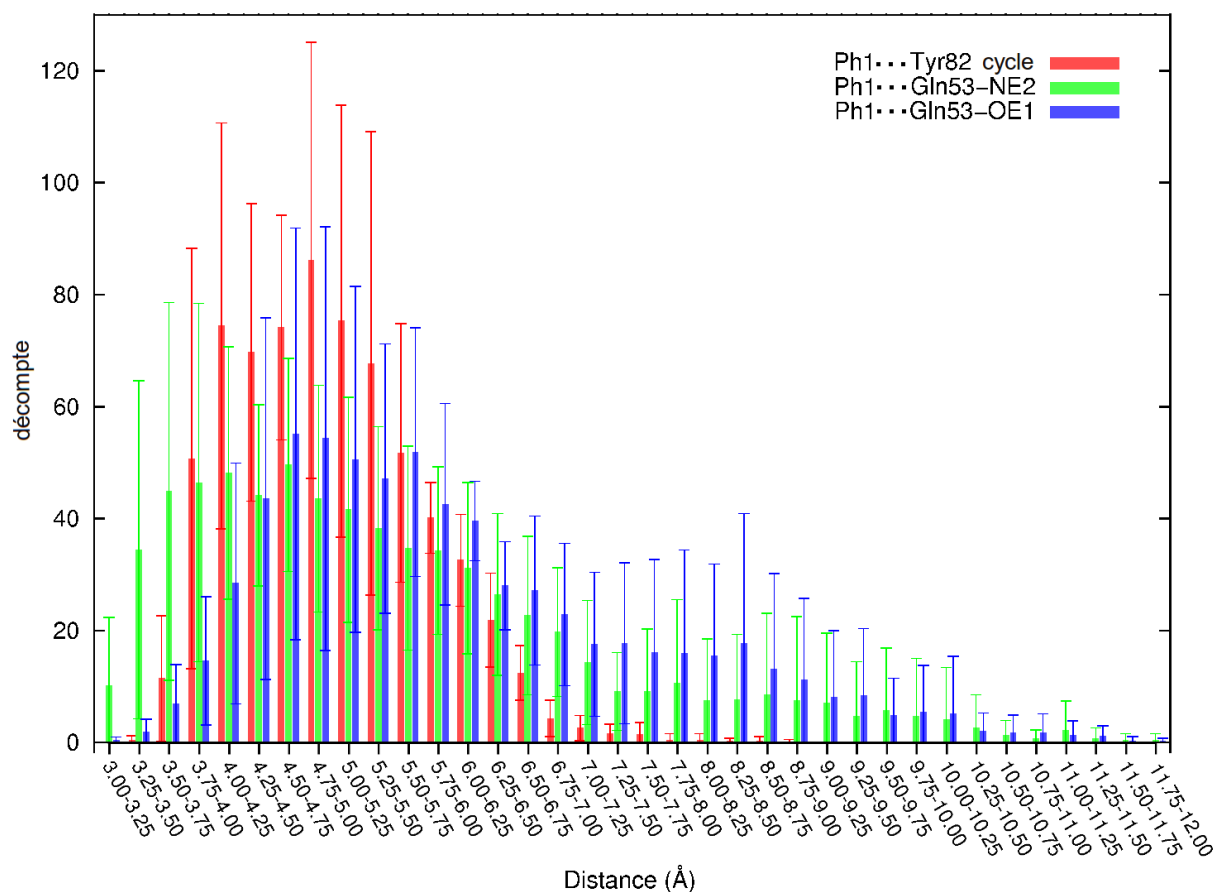


FIGURE 5.8 – Histogramme des caractéristiques de distances particulières pour Ph1, Gln53 et Tyr82. Les valeurs des trois distances présentées sur la figure 5.7 (c) et obtenues à partir d’une simulation SBD donnée ont été regroupées en intervalle de 0,25 Å pour des distances comprises entre 3 et 12 Å. Les nombres moyens résultent de la prise en compte de l’ensemble des structures issues de toutes les simulations SBD de EI1. Sur l’axe des abscisses, la notation pour les intervalles de distance a-b indique un intervalle du type $[a ; b]$.

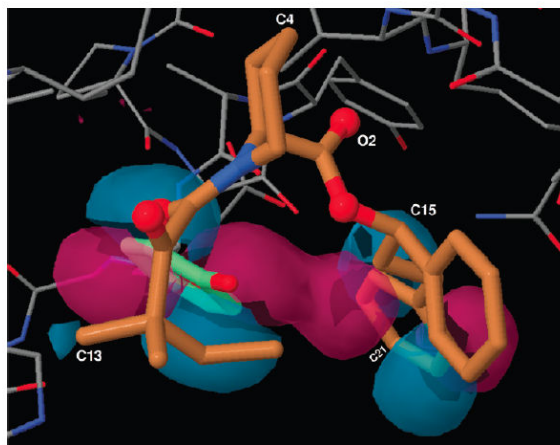


FIGURE 5.9 – Recouvrement orbitalaire entre la partie Ph1 de **8** (représenté en marron) et le cycle aromatique de la chaîne latérale du résidu Tyr82 (vert clair) calculé pour EI1 à un niveau de théorie semi-empirique en utilisant la méthode MOZYME combinée avec l'hamiltonien PM5, implémentée dans le programme MOPAC2006 [61]. L'orbitale moléculaire correspond à la HOMO-40 représentée avec une valeur d'isosurface de 0,008. Figure extraite de l'article de Olivieri et Gardebien [38].

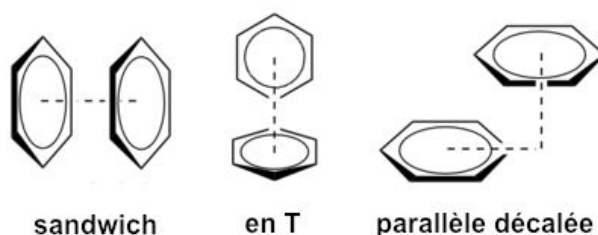


FIGURE 5.10 – Configurations principales retrouvées lors d'une interaction de type π - π entre deux cycles aromatiques.

TABLEAU 5.7 – Énergies d'interaction calculées pour les couples parties périphériques de **8**/résidus de FKBP12 qui forment le plus d'interactions dans EI1. Les énergies d'interaction entre chaque partie périphérique du ligand et l'ensemble de la protéine ont également été calculées. Toutes les valeurs sont des moyennes d'ensemble.

	Ph1-53	Ph1-82	Ph2-53	Ph2-54	iPe-82	iPe-87	Ph1-prot	Ph2-prot	iPe-prot
E_{totale}	$-1,28 \pm 0,45$	$-2,78 \pm 0,21$	$-1,14 \pm 0,36$	$-0,62 \pm 0,11$	$-0,72 \pm 0,15$	$-1,43 \pm 0,12$	$-7,13 \pm 0,60$	$-3,45 \pm 0,56$	$-3,47 \pm 0,11$
E_{vdW}	$-1,01 \pm 0,16$	$-2,46 \pm 0,15$	$-0,89 \pm 0,32$	$-0,95 \pm 0,04$	$-0,64 \pm 0,14$	$-1,47 \pm 0,11$	$-6,21 \pm 0,54$	$-3,30 \pm 0,43$	$-3,37 \pm 0,05$
$E_{\text{électrostatique}}$	$-0,27 \pm 0,21$	$-0,32 \pm 0,07$	$-0,25 \pm 0,15$	$0,34 \pm 0,11$	$-0,08 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,06$	$-0,93 \pm 0,11$	$-0,15 \pm 0,23$	$-0,10 \pm 0,06$

TABLEAU 5.8 – Énergies d'interaction calculées pour les couples parties périphériques de **308**/résidus de FKBP12 qui forment le plus d'interactions dans EI2. Les énergies d'interaction entre chaque partie périphérique du ligand et l'ensemble de la protéine ont également été calculées. Toutes les valeurs sont des moyennes d'ensemble.

	Ethe-53	Ethe-55	Ethe-56	Ethe-82	Tol-82	Tol-87	Ethe-prot	<i>i</i> Bu-prot	Tol-prot
E_{totale}	$-1,20 \pm 0,31$	$-1,08 \pm 0,43$	$-1,85 \pm 0,44$	$-3,29 \pm 1,02$	$0,41 \pm 0,28$	$-1,84 \pm 0,21$	$-8,92 \pm 1,80$	$-2,37 \pm 0,55$	$-5,10 \pm 1,48$
E_{vdW}	$-1,28 \pm 0,29$	$-1,03 \pm 0,30$	$-1,31 \pm 0,35$	$-0,34 \pm 0,37$	$-1,16 \pm 0,40$	$-2,21 \pm 0,38$	$-5,54 \pm 0,67$	$-2,07 \pm 0,52$	$-5,71 \pm 1,31$
$E_{\text{électrostatique}}$	$0,09 \pm 0,13$	$-0,05 \pm 0,17$	$-0,54 \pm 0,13$	$-2,95 \pm 1,34$	$1,56 \pm 0,32$	$0,38 \pm 0,40$	$-3,38 \pm 1,25$	$-0,30 \pm 0,17$	$0,61 \pm 0,46$

Chapitre 6

Discussion

Dans ce chapitre, les caractéristiques de EI1 et EI2 sont comparées afin de faire ressortir leurs nombreux points communs. Les nombreuses similitudes entre les deux états intermédiaires obtenus pour deux ligands de structure différente ont conduit à tester la transposition de ce modèle de l'état intermédiaire à d'autres cas de ligand, en particulier nous avons voulu transposer l'état intermédiaire au cas du ligand FK506. Les résultats semblent indiquer que notre modèle est transposable à d'autres ligands, nous avons analysé les différences d'affinité observées pour divers ligands de FKBP12 en raisonnant sur les informations obtenues à partir des EI. Après avoir discuté de l'importance des interactions de type π - π observées dans EI1 et de leur lien possible avec le phénomène de reconnaissance moléculaire, nous terminerons en présentant les propriétés structurales importantes du cœur des ligands.

1. Discussion des caractéristiques principales des EI

Les analyses de la séparation entre les centres de masse du site de fixation de FKBP12 et des parties de cœur des ligands **8** et **308** révèlent une position stable de ces ligands dans le site de fixation de FKBP12 dans EI. Les parties de cœur de **8** et **308** décrivent un ensemble de positions proches dans le site de fixation et dont les centres de masse sont respectivement à $4,90 \pm 0,12$ et à $3,81 \pm 0,14$ Å au dessus de leurs positions observées dans SC1 et SC2. Ce déplacement du ligand par rapport à la position observée dans l'état complexé permet la présence

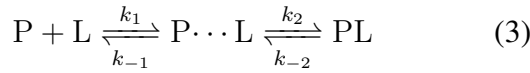
d'une couche d'eau entre le ligand et le fond du site de fixation, ce qui semble nécessaire à la stabilisation de l'état intermédiaire (voir section 2. p. 132). La stabilité des positions des ligands **8** et **308** dans les EI est confirmée par la présence de quelques interactions intermoléculaires permanentes, telles que **8**-O2...Val55/Ile56 et **8**-O3...Tyr82/Ile90 avec des distances respectives ne variant que faiblement (tableau 5.5 p. 152). La formation des contacts de van der Waals **8**-O2...Ile56-N pour EI1, **308**-O1...Ile56-N et **308**-O2...Tyr82-Oⁿ pour EI2 constituent des contacts précurseurs des liaisons hydrogènes trouvées dans SC1 et dans SC2. Le fait que les liaisons hydrogènes natives ne soient pas totalement formées dans EI indique que la formation de ces liaisons hydrogènes doit représenter un gain enthalpique jouant le rôle d'une force motrice entre ces deux états.

À l'inverse de la partie de cœur du ligand **8**, les trois parties périphériques (*i*Pe, Ph1 et Ph2) possèdent de fortes mobilités (valeurs de RMSF élevées, voir tableau 5.5 p. 147) qui résultent des faibles hauteurs de barrière énergétique pour la rotation autour des liaisons covalentes C17-C16, C24-C15 et C9-C10 (voir figure 3.10 p. 67). De plus ces parties possèdent des géométries particulières : pseudo-équivalence des atomes **8**-C11, **8**-C13 et **8**-C14 dans la partie *i*Pe ; équivalence des liaisons covalentes C25-C26 et C29-C28 dans Ph2 ; et équivalence entre les deux faces du cycle aromatique de la partie Ph1 ainsi qu'entre ses liaisons covalentes C19-C20 et C23-C22. La grande mobilité des parties périphériques associées à leur géométrie particulière contribuent à ce qu'aucun contact intermoléculaire permanent ne soit formé mais qu'en revanche des contacts transitoires entre atomes équivalents des ligands et quelques résidus de FKBP12 soient formés. Récemment, l'importance de ce type de contact transitoire a été montrée dans une étude sur les contributions à l'entropie configurationnelle des chaînes latérales des résidus lors de la formation du complexe PKA/AKAP [122]. Les auteurs ont trouvé que l'affinité entre les deux protéines augmente avec le nombre de contacts transitoires formés entre des atomes équivalents des chaînes latérales hydrophobes des deux protéines. Les auteurs ont montré que plus ce nombre de contacts transitoires équivalents (appelés aussi alternatifs dans leur étude) augmente plus l'entropie configurationnelle augmente. Bien que leurs conclusions aient été tirées de l'analyse d'un complexe protéine-protéine natif, il est vraisemblable que dans le cas de EI1 et de EI2, ces contacts transitoires permettent d'aider le ligand à conserver une partie de l'entropie configurationnelle qu'il possède dans son état libre, tandis que les interactions

naissantes dans les EI peuvent contribuer à un gain enthalpique. Cette assertion est renforcée par les RMSF observées pour les atomes du ligand dans EI qui sont similaires à celles observées dans EC (figure 3.3. p. 146 ; à l'exception des parties Ethe et *i*Bu dans EI2). L'aspect dynamique des contacts protéine-ligand permet également d'éviter la formation d'un état intermédiaire trop stable qui piègerait le système dans un puits de la surface d'énergie potentielle dont il ne pourrait s'échapper, ce qui empêcherait la formation de l'état complexé final. La diminution des RMSF pour les parties Ethe et *i*Bu entre l'état libre pour le ligand **308** et EI2 est due, pour Ethe, à une liaison hydrogène quasiment formée qui est un type de liaison directionnelle, imposant donc une orientation particulière pour Ethe (une distance moyenne calculée sur les 13 sur 17 simulations où elle est présente est $\sim 2 \text{ \AA}$ entre Tyr82-O $^\eta$ et **308**-O2) ; pour *i*Bu, à des contacts intramoléculaires formés avec la partie Tol dans EI2 et très peu dans l'état libre.



$$K_a = [PL]/([P][L]) = k_{on}/k_{off} \quad (2)$$



$$k_{on} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \quad (4)$$

$$k_{off} = \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2} \quad (5)$$

Pour les deux EI, nous avons vu qu'il y avait de nombreuses interactions, notamment celles transitoires. L'ensemble de ces interactions formées entre la protéine et le ligand dans EI permettent de stabiliser la position du ligand dans le site de fixation, comme discuté précédemment. Ces interactions contribuent à augmenter le temps de vie de EI et ainsi à diminuer la constante de vitesse k_{-1} dans l'équation (3) (vue dans l'introduction p. 10 et reprise ci-dessus). La diminution de k_{-1} entraîne, d'après l'équation (4), une augmentation de k_{on} et donc aussi de K_a d'après l'équation (2). Le lien entre les interactions nombreuses trouvées dans EI et l'incidence sur k_2 est plus difficile à montrer, une augmentation de k_2 entraînant également une augmentation de k_{on} . Il n'est cependant pas impossible qu'un tel lien existe, surtout si EI a une structure proche de celle de l'état de transition T qui sépare EI de EC. Dans ce cas, deux étapes intéressantes lors du passage de EI vers EC permettraient alors une augmentation de la constante k_2 .

La première est la désolvatation des parties hydrophobes telles que C2N7 de **8** et C2SN7 de **308** qui sont dans l'état intermédiaire respectif encore en contact avec l'eau (figure 5.6 p. 163) alors qu'elles sont très enfouies dans la cavité principale dans EC. La deuxième correspond à la formation des liaisons hydrogènes « pré-formées » dans EI. Ces deux étapes sont en réalité associées à deux contributions, entropique pour la première et enthalpique pour la deuxième, favorisant le passage alors de T au complexe EC. Donc, dans le cas où EI et T sont proches en termes de structure et d'énergie, nous pouvons alors anticiper que les deux facteurs précédents vont augmenter k_2 et, par conséquent, k_{on} et K_a .

Une autre caractéristique importante des états intermédiaires est associée à la structure de la boucle 80. Comme discuté dans l'introduction p. 5 pour le complexe FKBP12-**8**, le ligand **8** mais aussi le ligand **308** sont largement enfouis dans le site de fixation de FKBP12 : les cycles C2N7 et C2SN7 sont enfouis dans la cavité principale et le groupement méthyle de l'atome **8**-C13 ainsi que la partie Tol du ligand **308** sont enfouis dans la petite cavité latérale formée par les chaînes latérales des résidus Tyr82, His87, Ile90 et Ile91. Donc, sans déplacement des chaînes latérales de ces quatre résidus, celles-ci pourraient gêner stériquement la sortie ou l'entrée des ligands dans le site de fixation de FKBP12. Une conclusion similaire a été tirée par Zacharias lors de son étude par *docking* rigide du ligand FK506 sur FKBP12, complexe dans lequel le groupement méthyle de l'atome FK506-C35 remplit la même petite cavité latérale que celle remplie par le groupement méthyle de l'atome **8**-C13 ou par la partie Tol de **308** [27]. Toutefois, dans un mécanisme de complexation passant par la formation d'un état intermédiaire tel que EI1 ou EI2, le mouvement concerté des chaînes latérales volumineuses de la boucle 80 expose la petite cavité au ligand qui s'approche, permettant ainsi à des parties du ligand d'amorcer la formation des interactions avec FKBP12. En effet, dans EI1, l'atome **8**-O3 pointe vers la petite cavité et forme une interaction stable avec la chaîne latérale du résidu Ile90 ainsi que de faibles interactions avec celle du résidu Tyr82 (tableau 5.5 p. 152 et partie droite de la figure 5.4 p. 134). Une conséquence importante d'un tel mécanisme de complexation à deux étapes, par opposition à un mécanisme à une seule étape, correspond à la diminution drastique de la barrière énergétique d'association due à la fois aux interactions protéine-ligand naissantes et à la réduction de la gêne stérique ; ces deux causes peuvent être considérées respectivement comme des contributions enthalpiques et entropiques (moins de contraintes structurales pour

le ligand que pour le mécanisme à une étape dans lequel le ligand doit interagir avec la cavité principale de même qu'avec la cavité latérale).

Dans les états intermédiaires, le déplacement observé de la boucle 80 est en accord avec la conclusion de précédentes analyses comparatives des formes liées et libres de FKBP12 [28, 104], ainsi qu'avec des données issues d'étude par RMN qui indiquent qu'au moins deux conformations distinctes de la boucle 80 dans la protéine dans son état libre doivent exister [30]. Le déplacement de la boucle 80 observé dans les deux états intermédiaires est de plus justifié d'une certaine manière par une étude de *docking* réalisée sur un jeu de 20 complexes protéine-protéine [123]. Bien que cette étude n'ait pas traité du *docking* de petits ligands comme **8** ou **308** à FKBP12, leur conclusion pourrait tout à fait être valable dans le cas de complexe protéine-ligand. Ces auteurs ont trouvé que les régions des protéines, qui empêchaient la formation des complexes à cause de gênes stériques, subissaient des changements conformationnels de manière à permettre la reconnaissance et l'association entre des partenaires protéiques.

2. Transposition du modèle de l'état intermédiaire à d'autres ligands de FKBP12

Dans le but de vérifier la transposition de notre modèle de l'état intermédiaire à des complexes formés par FKBP12 avec d'autres ligands, le **8** dans EI1 a été remplacé par FK506. Ce remplacement repose sur l'hypothèse que le mécanisme de complexation de FK506 à FKBP12 fait intervenir la formation d'un état intermédiaire proche du modèle de l'état intermédiaire, lui-même similaire à EI1. Le ligand FK506, de plus grande taille que le ligand **8**, a été positionné dans le site de fixation de FKBP12 dont la structure est tirée de EI1 en alignant les deux parties de cœur des deux ligands qui sont communes (voir figure 6.1). La structure du ligand FK506 qui a été utilisée correspond à la structure cristallographique de ce ligand tirée de la structure cristallographique du complexe FK506-FKB12 (code PDB : 1FKJ). Il est important de noter qu'aucun ajustement n'a été effectué afin de faire correspondre le ligand à la structure particulière du site de fixation de FKBP12 observée dans EI1. Le résultat de la superposition des ligands **8** et FK506 dans le site de fixation de FKBP12 tel qu'observé dans EI1 est représenté sur la figure 6.1. Malgré le fait que ni les positions des atomes de la protéine (notamment des

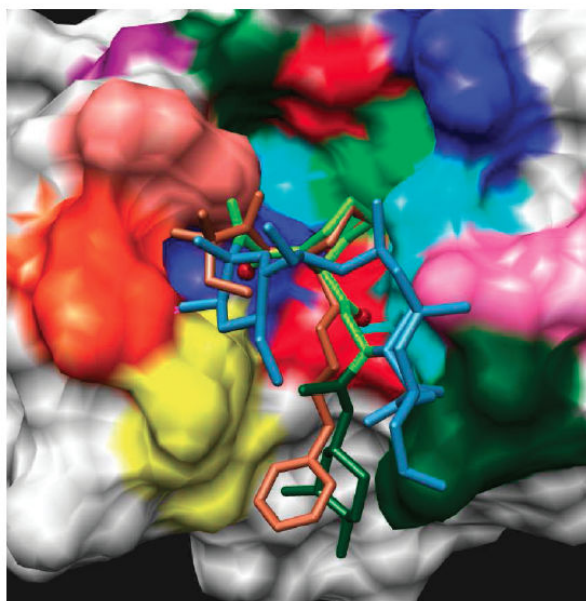


FIGURE 6.1 – Superposition des parties de cœur des ligands **8** et FK506 sur la structure de l’EI1. Le code couleur utilisé pour la protéine est identique à celui de la figure 5.4 p. 134. Le ligand **8** est coloré en marron clair, et les atomes O2 et O3 sont représentés en sphères de couleur rouge. FK506 est coloré comme ceci : la partie de cœur (C9-C26) en vert clair, la partie cyclohexyle (C27-C34) en vert foncé et le domaine effecteur (C25-C10) en bleu. Pour des raisons de clarté les atomes de la partie Ph2 de **8** ne sont pas représentés. Figure extraite de l’article de Olivieri et Gardebien [38].

chaînes latérales des résidus Tyr82 et His87), ni celles de ceux de FK506 n’aient été ajustées, très peu de recouvrement de sphères de van der Waals sont observés.

Il est intéressant de constater que le ligand FK506 s’ajuste bien au site de fixation de la protéine dans l’état intermédiaire en conservant la plupart des contacts observés pour **8**. En particulier, les distances séparant les atomes des couples FK506-O2... Ile56-N et FK506-O3... Ile90-C γ^2 sont toutes les deux compatibles avec une interaction de van der Waals (respectivement 3,45 et 3,57 Å sur la structure instantanée de la figure 6.1). Le groupement méthyle de l’atome FK506-C35 qui pointe vers le noyau imidazole du résidu His87 possède une position équivalente aux groupements méthyles ou méthylène lié à l’atome **8**-C10^a. Sur la figure 6.1, il est

^a. Au niveau des états natifs respectifs, le groupement méthyle de l’atome FK506-C35 remplit la même cavité que le groupement méthyle de l’atome **8**-C13.

possible de voir que le groupement cyclohexyle (C29-C34) du ligand FK506 joue le même rôle que la partie Ph1 de **8**, et comme Ph1 qui est très mobile, ce groupement est connu pour être très mobile [124]. Lors de l'utilisation du modèle de EI pour le complexe FK506-FKBP12, des interactions de types C-H... π et O-H... π entre le cycle C29-C34 ou l'atome de la fonction hydroxyle FK506-O¹² et le résidu Tyr82 peuvent être considérées comme «équivalente» aux interactions de type π - π observées dans EI1 (figures 1.1 (B) p. 4 et 6.1)^b. Ainsi, quelques configurations de FKBP12 qui ont été prises à partir des simulations SBD de EI1 ont permis un placement du ligand volumineux FK506 dans le site de fixation, sans engendrer d'importantes gênes stériques tout en retenant les caractéristiques décrites pour **8**. Ceci suggère la transposition possible du modèle de l'état intermédiaire défini dans cette étude à d'autres complexes FKBP12-ligand.

3. Les EI permettent d'expliquer les différences d'affinité entre certains ligands de FKBP12

L'analyse des états intermédiaires permet de comprendre le rôle des parties périphériques mobiles des ligands **8** et **308** (respectivement Ph1, Ph2 et *i*Pe, et Ethe, *i*Bu et Tol) lors du mécanisme de complexation. Puisque ces six parties périphériques forment de nombreux contacts avec quelques résidus de FKBP12 pour stabiliser EI1 et EI2, il est possible de comprendre comment ces parties accroissent les capacités de complexation de ces ligands. La comparaison des valeurs de constante d'affinité de quelques ligands proches structuralement de **8** indique que l'affinité est plus faible lorsqu'une de ces trois parties périphériques (Ph1, Ph2 et *i*Pe) est manquante [19, 17]. La modification d'une de ces parties entraîne également d'importantes conséquences sur les valeurs de constante d'affinité. En effet, les ligands qui possèdent un groupement tert-butyle lié à l'atome C9 ont une affinité mesurée plus importante que ceux possédant un groupement iso-pentyle [125]. Cette modification entraîne vraisemblablement une rotation plus facile autour de la liaison covalente C9-C10 de part l'absence de gêne stérique due au groupement méthyle de l'atome **8**-C12 dans *i*Pe. Cette rotation plus facile permet vraisemblablement

^b. Il est possible de raisonner de la même manière pour la rapamycine pour laquelle des interactions similaires peuvent faire intervenir le cycle C37-C42 et l'atome d'oxygène de la fonction hydroxyle rapamycine-O¹³.

d'augmenter l'entropie configurationnelle pour cette partie tout en conservant des interactions transitoires comme dans *i*Pe. D'autres ligands de haute affinité pour FKBP12 possèdent des dérivés du phényle ou du méthoxyphényle liés à l'atome C9, à la place de la partie *i*Pe [23]. Dans l'hypothèse où le modèle de l'état intermédiaire est transférable à d'autres complexes FKBP12-ligands (voir section 2. p. 181), le groupement phényle (ou les dérivés phényle) lié à l'atome C9 contribuerait à une interaction de type empilement aromatique formé avec le noyau imidazole du résidu His87 et/ou du cycle aromatique du résidu Tyr82 permettant de stabiliser les deux partenaires dans l'état intermédiaire, tel qu'observé pour la partie Tol de **308** dans EI2. Pour comprendre le rôle de la partie Ph2, la différence entre l'affinité du ligand **5**, analogue au ligand **8** (figure 6.2), et celle du ligand **8** est analysée. Le ligand **5** possède une valeur de constante d'inhibition 11 fois plus élevée que **8** (110 contre 10 nM). Il faut souligner que la partie Ph2 de **8** joue un double rôle : (i) permettre la formation de contact au niveau de EI1 (en effet, nous avons vu que la partie Ph2 forme quelques contacts transitoires avec la protéine qui participent à la stabilisation de EI1) ; et (ii) limiter la mobilité de la partie voisine Ph1. L'analyse des profils énergétiques de torsion autour de la liaison covalente C15-O1 (figure 3.10 p. 67) révèle que l'encombrement dû à la partie Ph2 restreint considérablement les rotations autour de cette liaison covalente. Ainsi, les mouvements de la partie Ph1 de **8** sont limités par l'encombrement stérique causé par la partie Ph2 et restreint beaucoup plus l'espace balayé lors des mouvements du cycle aromatique du ligand **8** comparé aux mouvements du groupement équivalent à Ph1 dans **5**. Cette diminution des mouvements permet de stabiliser la position de la partie Ph1 plus près du cycle aromatique du résidu Tyr82 augmentant de ce fait la probabilité d'interaction entre les deux cycles aromatiques. Donc, la présence de la partie Ph2 liée à l'atome **8**-C15 contribue indirectement à accroître l'interaction électronique de type π - π observée dans EI1 (figure 5.9 p. 173). Cette contribution pourrait expliquer la différence de nombre de contacts formés dans EI1 et l'état intermédiaire équivalent pour le ligand **5**. Comme expliqué précédemment, le nombre de contacts serait plus élevé dans le cas du ligand **8**, comparé à **5**, dans l'état intermédiaire, la valeur de k_{-1} et/ou k_2 pour la complexation de **8** serait donc respectivement plus faible et plus élevée que pour la valeur respective dans le cas de **5**, d'où l'incidence possible sur les affinités mesurées. Pour le ligand **9** qui correspond à **8** avec un cyclohexyle à la place du cycle aromatique Ph2 (figure 6.2), la constante d'inhibition est similaire (7 contre 10 nM) ; cette com-

paraison suggère que la nature aromatique du substituant directement lié à l'atome C15 n'est pas essentielle. D'un autre côté, la substitution de la partie Ph2 par un groupement 1,1-diméthyl-2-propenyle comme pour le ligand **7** résulte en une affinité 25 fois plus faible que pour **8** (250 nM) [17]. D'après notre transposition du modèle EI aux les deux ligands **7** et **9** analogues à **8**, nous pouvons anticiper que, contrairement au groupement non-symétrique de **7**, la symétrie du substituant cyclohexyle utilisé pour le ligand **9** permet la formation de contacts transitoires avec le résidu Glu54 de même nature (contacts équivalents) après rotation de ce groupement, comme observé pour la partie Ph2 de **8** (voir sous-section 3.4.2. p. 162). De ces comparaisons, il ressort que le nombre de contact formé dans les EI et qui contribue à stabiliser ces états semble lié à l'affinité des quelques ligands analogues aux ligands **8** et **308** présentés ici (lorsque ce nombre augmente, k_{-1} diminue et il est aussi possible dans certains cas au moins que k_2 augmente).

Une des caractéristiques intéressantes de EI1 correspond à la formation d'une interaction de type π - π entre la protéine et le ligand. Dans EI, ce type d'interaction électronique à courte distance pourraient expliquer, au moins en partie, la différence entre les K_i mesurés par Holt *et al.* [17] pour les ligands **5** et **6** (figure 6.2). Ces deux ligands se composent de la partie *i*Pe et du cœur de **8** mais diffèrent dans leurs parties liées à la fonction ester. Pour le ligand **6**, les trois groupements méthoxy sont des donneurs d'électrons pour le cycle aromatique auxquelles ils sont liés. Ces groupements sont ainsi responsables d'un enrichissement de la densité électronique sur les deux faces de ce cycle aromatique, comparativement au cycle aromatique non-substitué du ligand **5**. Comparé à **5**, pour le ligand **6**, la densité électronique hors du plan du cycle aromatique substitué peut accroître les interactions cofaciales avec le cycle aromatique du résidu Tyr82. Dans l'hypothèse où la stabilité de l'état intermédiaire est liée à l'affinité de FKBP12 pour le ligand, la stabilisation accrue de EI pour le ligand **6** par rapport au ligand **5** pourrait expliquer, du moins en partie, la différence d'affinité pour ces deux ligands.

4. Importance des interactions de type π - π dans la reconnaissance moléculaire

Concernant la partie Ph1 du ligand **8**, il est frappant de voir que presque tous les ligands synthétiques de haute affinité pour FKBP12 contiennent un noyau aromatique (noyau phényle,

186

pyridyle ou triméthoxylphényle) lié par un groupement propyle au cœur du ligand [19]. La présence de ce groupement aromatique ainsi que la longueur du bras alkyle qui le lie au cœur du ligand semblent donc cruciaux pour les propriétés de complexation à FKBP12. Les résultats pour les EI présentés dans cette étude fournissent une compréhension détaillée sur le rôle joué par de tels groupements aromatiques lors du processus de reconnaissance des partenaires de complexation. Premièrement, comme décrit précédemment, la partie Ph1 de **8** est celle qui participe au plus grand nombre de contacts (tous transitoires) avec FKBP12 dans EI1. Il participe également à environ sept contacts transitoires dans EC1 (environ trois avec chacun des résidus His87 et Tyr82 et un avec Gly86 ; figures 4.8 p. 118 et 5.11 p. 174). Deuxièmement, dans EI1 parmi les valeurs de RMSD de toutes les parties de **8**, la partie Ph1 possède la valeur la plus faible ($4,15 \pm 0,19$ Å ; tableau 5.4 p. 144). Cette valeur indique que dans EI1 la partie Ph1 est celle dont la position est la plus proche de la position qu'elle occupe dans SC1 comparativement aux autres parties du ligand. En d'autres termes, lors de l'étape de complexation entre EI1 et SC1, la partie Ph1 est celle qui se déplace le moins. D'autre part, l'analyse de la nature des contacts formés entre la partie Ph1 et le résidu Tyr82 obtenue à partir des calculs semi-empiriques d'orbitales moléculaires indique un recouvrement orbitalaire entre les faces des cycles aromatiques de la partie Ph1 et de la chaîne latérale du résidu Tyr82, comme illustré sur la figure 5.9 p. 173.

D'un point de vue expérimental, l'importance du caractère aromatique du résidu 82 de FKBP12 dans la complexation aux ligands peut également être observée sur des mesures de l'activité rotamase sur des mutants Y82F et Y82D de la protéine. La mutation du résidu Tyr82 en résidu Phe diminue l'affinité de FK506 et de la rapamycine seulement d'un facteur 2 environ [4]. D'autres expériences réalisées sur la complexation de la rapamycine à FKBP12 issue de la levure indiquent une perte de 95% de l'affinité pour le mutant Y89D [126]^c. Les résultats précédents suggèrent que le caractère aromatique de la chaîne latérale du résidu Tyr82 est crucial pour la complexation, contrairement à la formation de la liaison hydrogène formée entre l'atome O3 des ligands et le résidu Tyr82. Ces observations sont en accord avec EI1 pour lequel des interactions électroniques à courte distance sont formées avec le cycle aromatique du résidu Tyr82 tandis que la liaison hydrogène qui doit se former avec ce résidu dans EC1 n'est pas encore présente à cette étape. Dans une analyse plus récente des activités enzymatiques de

^c. Le résidu Tyr89 de FKBP12 chez la levure correspond au résidu Tyr82 de cette protéine chez l'homme.

mutants de FKBP12, il a également été démontré que, parmi les 19 substitutions possibles du résidu 82, les résidus possédant une chaîne latérale aromatique (Phe, Tyr et Trp) entraînent la plus forte activité, ainsi que les résidus Arg (qui contient également un réseau π conjugué) et Pro [127]. Ces découvertes expérimentales soulignent donc là encore l'importance du caractère aromatique pour le résidu 82 de FKBP12.

Dans les EI et les EC, le résidu Tyr82 participe à un grand nombre de contacts avec les ligands, notamment avec les parties périphériques Ph1 de **8** et Ethe et Tol de **308**. Ce résidu semble jouer un rôle important dans la reconnaissance des ligands qui viennent se complexer à FKBP12. D'une manière plus générale, l'importance du résidu tyrosine pour la reconnaissance moléculaire a été montrée par Koide et Sidhu [128]. Sur la base de comparaison de plusieurs études sur les interactions protéine-protéine, Koide et Sidhu ont montré que la tyrosine participe à la fois à l'affinité et également à la spécificité d'une protéine. Cette spécificité proviendrait d'une diminution de la mobilité de sa chaîne latérale, comme observé lors du passage entre EI1 et EC1 pour le ligand **8** ou lors du passage de l'état de libre diffusion de FKBP12 et de **308** vers EI2 (figure 5.5 p. 147). Cette diminution de la flexibilité de la tyrosine semble permettre de former des interactions spécifiques. De plus, la tyrosine a plusieurs caractéristiques physicochimiques particulières puisqu'elle est amphipatique et volumineuse, et qu'elle peut former un grand nombre d'interactions de différents types (CH- π , π - π , cation- π , liaison hydrogène, *etc*). Dans notre étude des états EI et EC, le résidu Tyr82 forme un grand nombre de type d'interactions différents avec les ligands **8** et **308** (voir figure 5.11 p. 174). Enfin, Koide et Sidhu ont conclu que ces propriétés physicochimiques spéciales de la tyrosine permettait de la rendre plus efficace pour la reconnaissance moléculaire par rapport aux autres acides aminés codés génétiquement.

5. Propriétés structurales importantes du cœur des ligands de FKBP12

L'analyse des EI fournit aussi des indices sur l'explication de la diversité des structures retrouvées pour les parties de cœur des ligands de haute affinité. Les interactions interatomiques permanentes et persistantes dans l'ensemble des simulations SBD sont peu nombreuses, res-

pectivement six et sept dans EI1 et EI2. Il est intéressant de remarquer les similitudes entre ces interactions dans les deux cas : pour **8**, quatre de ces interactions sont formées entre **8**-O2 et les résidus Val55/Ile56, une entre **8**-O3 et Ile90 ; pour **308**, trois entre **308**-O1, équivalent structural de **8**-O2, et Val55/Ile56, une entre **308**-O5, équivalent de **8**-O3, et Ile90. Nos résultats indiquent donc que les atomes **8**-O2 et **8**-O3, ou leur équivalent **308**-O3 et **308**-O5, sont ceux qui forment la majorité des interactions permanentes trouvées dans EI, agissant comme deux points d'ancrage. Ces résultats suggèrent que la présence de deux tels atomes dans la partie de cœur d'un ligand est importante pour la complexation à FKBP12. Il est intéressant de constater que, lorsque les structures des ligands de haute affinité pour FKBP12 sont comparées afin d'extraire un motif structural commun, les atomes équivalents à **8**-O2 et **8**-O3 sont retrouvés de manière récurrente, tel qu'illustré sur la figure 6.2 (b). Il est important de noter que dans ce motif, les cycles pipicolinyle ou pyrrolidinyle ne semblent pas être requis pour une haute affinité puisqu'un cycle thiazane [15] ou même des formes de type alkyle ouverte pour le cycle central sont aussi trouvés dans des ligands de haute affinité [25]. En fait, Zhao *et al.*, dans leur étude sur la capacité de différents ligands de FKBP à promouvoir la croissance neuritique, ont même conclu que la structure précise (cyclique ou linéaire) de la partie centrale d'un ligand de cette protéine est moins importante que la nature des substituants périphériques liés au cœur du ligand [25]. Un autre résultat important de leur étude est que les parties les plus importantes du ligand pour la promotion de la croissance neuritique sont les groupements qui sont liés au cœur du ligand du côté de la fonction ester, *i.e.* la partie Ph1 dans le cas du ligand **8** par exemple, ou encore la partie EtHe dans le cas de **308** [25]. Pour la sous-partie C9O4 trouvée dans le cœur de **8**, Orozco *et al.* ont déduit de leur étude que cette sous-partie n'est pas importante pour la complexation des ligands à FKBP12 [129]. Leurs résultats sont également en accord avec l'observation que certains ligands de haute affinité ne possèdent qu'un seul groupement cétone (C8O3) à la place de la fonction α -dicétone (C8O3C9O4) [23] ; d'autres ligands de haute affinité comme le ligand **308** possèdent un groupement sulfonyle à la place de cette fonction α -dicétone [15]. D'après les analyses précédentes du cœur des ligands se liant à FKBP12, les atomes équivalents à **8**-O2 et **8**-O3 apparaissent comme les principaux atomes récurrents. Dans l'hypothèse que le modèle EI présenté dans notre étude peut être transposé à d'autres complexes formés entre FKBP12 et des ligands analogues à **8** et **308**, la prépondérance des atomes équivalents à **8**-O2 et **8**-O3

dans les ligands de FKBP12 s'explique alors par leur rôle de points d'ancrage dans les états intermédiaires correspondants. Nos résultats permettent donc de rationaliser l'observation que les parties de cœur de ligands structuralement très divers, mais ayant en commun les atomes équivalents à **8-O2** et **8-O3**, peuvent se lier à FKBP12.

Chapitre 7

Conclusion

Deux états intermédiaires, EI1 et EI2, ont été caractérisés pour les chemins de décomplexation des complexes FKBP12-**8** et FKBP12-**308**. Au préalable, le protocole utilisé combinant les méthodes de dynamique moléculaire LD et de représentation de l'énergie libre de solvation EEF1 a été testé à partir des complexes natifs respectifs. Nous nous sommes assurés que ce protocole permettait de reproduire les caractéristiques expérimentales de ces complexes, en particulier la structure de la protéine et, pour les partenaires protéine-ligand, leur position relative ainsi que leurs interactions intermoléculaires. Dans le but de tester la validité des simulations LD mais aussi d'avoir une base de comparaison avec les résultats pour les EI, des simulations SBD ont été réalisées conjointement. Les résultats indiquent, pour les deux types de simulation et pour les deux complexes, que toutes les caractéristiques expérimentales sont reproduites de manière satisfaisante, avec toutefois des déformations observées pour la boucle 80. Pour les deux ligands, la partie cœur se caractérise par de nombreuses interactions permanentes et des fluctuations calculées qui sont faibles, à l'inverse des parties périphériques *i*Pe, Ph1, Ph2 dans **8** ou Ethe, *i*Bu et Tol dans **308** qui se caractérisent par des interactions transitoires et des fluctuations plus élevées (hormis les atomes de la fonction ester de **308**).

Le type de simulation LD validé, celui-ci a été combiné avec la méthode BMD afin d'obtenir des états intermédiaires selon un protocole spécifique. Pour chaque complexe, un état intermédiaire a été caractérisé par des simulations LD dans un premier temps, puis par des simulations SBD. Cette procédure a permis d'éliminer des états pour lesquels les résultats n'étaient pas homogènes entre les deux types de simulation. En revanche, pour les deux états intermédiaires

caractérisés, le fait que des résultats similaires aient été obtenus pour les deux types de simulation rend confiant sur la validité des états identifiés. Le ligand se trouve dans EI1 et EI2 à une distance de la protéine qui lui permet de former très peu d'interactions permanentes, la majorité d'entre elles est formée par quelques atomes du cœur du ligand. En plus de ce faible nombre d'interactions permanentes, la position du ligand est stabilisée par d'autres types d'interactions, transitoires, formées principalement par les parties périphériques du ligand, parties qui montrent des fluctuations qui restent élevées dans les deux EI (à l'exception de Ethe et *i*Bu pour les raisons évoquées). Ces interactions transitoires sont probablement liées à l'affinité du ligand puisqu'il a été montré, dans le contexte des interactions protéine-protéine, que leur quantité détermine l'affinité [122]. En effet, comme discuté dans le chapitre précédent, ces interactions développées dans EI ont une incidence directe sur la valeur de la constante de vitesse de dissociation k_{-1} de EI, mais aussi probablement indirectement sur la valeur de k_2 , la constante de vitesse pour la réaction d'association entre EI et l'état complexé correspondant.

Une autre caractéristique intéressante de EI est le déplacement de la boucle 80 et qui concerne en majorité les résidus de l'extrémité de cette boucle (autour de Gly89). Ce déplacement permet d'exposer la petite cavité latérale formée par les chaînes latérales volumineuses de cette boucle aux atomes du ligand rentrant, contribuant à diminuer globalement la pénalité entropique pour le ligand dans le processus de complexation.

Les résultats similaires obtenus entre EI1 et EI2 nous ont conduits à tester la possibilité de transposer EI à un autre ligand volumineux tel que FK506. Ce test, de même que la similarité des caractéristiques de EI1 et EI2, sont des arguments qui semblent valider l'idée de pouvoir transposer cet EI à d'autres ligands. La transposition de notre modèle EI à d'autres ligands nous a permis de rationaliser les différences d'affinité entre **8** et d'autres ligands partageant le même cœur mais différant par leurs parties périphériques. Comme nous l'avons vu, les raisons de ces différences tiennent vraisemblablement dans les possibilités de contact qui sont différentes dans les EI respectifs, de même que des contacts de nature différente dans le cas d'autres ligands.

Un résultat important sur ces interactions trouvées dans EI concerne le résidu Tyr82 et ses interactions de type $\pi-\pi$ pour la partie Ph1 de **8** et sa liaison hydrogène avec Ethe de **308**. En particulier pour **8**, les caractéristiques de EI1 permettent de comprendre l'importance maintes fois démontrée du caractère aromatique du résidu 82 dans FKBP12. En effet, des interactions

fortes π - π sont calculées entre Tyr82 et Ph1 dans EI1. Nous conjecturons que, dans d'autres systèmes protéine-ligand, les interactions électroniques à courte distance de type π - π entre un groupement aromatique du ligand et un résidu aromatique de la protéine, comme entre Ph1 de **8** et Tyr82, peuvent jouer un rôle crucial dans les étapes préliminaires du processus de reconnaissance entre partenaires. Cette étape cruciale pourrait avoir lieu dans un EI comme pour EI1, ce qui expliquerait le paradoxe suivant qui est que, dans les structures cristallographiques de nombreux complexes protéine-ligand, certaines régions d'un ligand donné sont reconnues comme déterminantes pour l'affinité (telles que Ph1 dans de nombreux ligands analogues à **8**) alors que leur nombre d'interactions formées avec la protéine n'est souvent pas très important [130]. Il a été observé également qu'à l'inverse, des régions du ligand qui interagissent fortement dans le complexe peuvent être substituées sans grande incidence sur l'affinité mesurée [130]. Notre hypothèse est de plus confortée par l'observation générale que, dans les structures connues des médicaments actuellement utilisés, les cycles aromatiques sont des motifs récurrents. Du côté de la structure des protéines, les résidus Trp, Tyr et Arg (qui possède aussi un système π conjugué) ont été reconnus comme déterminants pour la liaison ou la reconnaissance des ligands. Deux exemples avec la protéine PDIp (analogue de la protéine disulfide isomérase) pour laquelle il a été démontré qu'un résidu Tyr ou Trp est suffisant pour la reconnaissance [131] ou encore la métallo- β -lactamase dans laquelle un résidu exposé Trp49 permet la liaison au ligand et que, plus important, cette liaison est également possible après la mutation W49F ; les auteurs soulignant que seul le caractère aromatique du résidu permet la liaison [132]. Enfin, les régions de liaison des anticorps sont connues pour être abondantes en résidus Tyr et Trp [133].

Les résultats pour EI1 et EI2 permettent également de comprendre la prépondérance des atomes O2 et O3 (ou leur équivalent structural tel que O1 et O5 dans **308**) dans les ligands de haute affinité puisqu'ils agissent comme deux points d'ancrage contribuant en partie à fixer le ligand à la protéine dans EI (cinq et quatre interactions permanentes sont formées respectivement par O2/O3 de **8** et O1/O5 de **308**). Ces résultats permettent aussi de proposer une explication à l'apparente contradiction entre l'observation que le cœur des ligands de FKBP12 forme systématiquement la majorité des contacts dans l'état complexé et qu'il peut néanmoins être modifié sans pour autant perdre en affinité ; ces modifications montrant toutefois toujours cette prépondérance des atomes du type O2 et O3 dans cette variété de ligands. Dans l'hypothèse où les

interactions qui sont développées dans EI ont une incidence sur k_{-1} et/ou k_2 , alors les interactions permanentes formées par O2 et O3, retrouvées dans des cœurs aussi différents que ceux de **8** et **308**, fournissent l'explication de l'importance de ces deux atomes du cœur pour l'affinité.

Annexes

TABLEAU A.1 – Nouveaux types atomiques définis pour les atomes des ligands **8** et **308**. Ces types atomiques ont été introduit afin d'éviter de modifier les paramètres pré-existants dans CHARMM22, notamment ceux du terme $E_{\text{angles dièdres}}$.

atomes du ligand 8	type atomique	epsilon	Rmin/2	eps,1–4	Rmin/2,1–4	type atomique correspondant dans CHARMM22
C23	C6R	–0,0700	1,9924			CA
C22						
C21						
C20						
C19						
C18						
C29						
C28						
C27						
C26						
C25						
C24						
C17	CT2P	–0,0550	2,1750	–0,0100	1,90	CT2
C15	COS	–0,0200	2,2750	–0,0100	1,90	CT1
O1	OS	–0,1521	1,7700	–0,2000	1,36	OS
O2	OCO	–0,1200	1,7000	–0,1200	1,40	O
C2	CR1	–0,0200	2,2750	–0,0100	1,90	CP1
C3	CR2	–0,0550	2,1750	–0,0100	1,90	CP2
C4		–0,0550	2,1750	–0,0100	1,90	CP2
C5		–0,0550	2,1750	–0,0100	1,90	CP2
C6	CR3	–0,0550	2,1750	–0,0100	1,90	CP3
N7	NR	–0,2000	1,8500	–0,0001	1,85	N
C8	COC	–0,1100	2,0000			C
C9	COC	–0,1100	2,0000			C
C10	CT0	–0,0200	2,2750	–0,0100	1,90	CT1

atomes du ligand 308	type atomique	epsilon	Rmin/2	eps,1–4	Rmin/2,1–4	type atomique correspondant dans CHARMM22
C2	CR1	–0,0200	2,2750	–0,01	1,90	CP1
C3	CR2	–0,0550	2,1750	–0,01	1,90	CP2
C4						
C5						
C6						
N7	NT	–0,2000	1,8500			NP
O1	OF	–0,1200	1,7000	–0,12	1,40	O
S8	SO2	–0,4700	2,1000			SL
O4	O2L	–0,1200	1,7000	–0,12	1,40	O2L paramètre 1–4 O
O5	O2L	–0,1200	1,7000	–0,12	1,40	O2L paramètre 1–4 O
S4	ST	–0,4500	2,0000			S
C31	COS2	–0,0550	2,1750	–0,01	1,90	CTL2
O2	OCO	–0,1200	1,7000	–0,12	1,40	OBL
C30	COO	–0,0700	2,0000			CL
C17	C6R	–0,0700	1,9924			CA
C18	C6RT	–0,0700	1,9924			CA
C19	C6R	–0,0700	1,9924			CA
C20						
C21						
C22						

ANNEXES

TABLEAU A.2 – Charges partielles des atomes des ligands **8** et **308**. Les colonnes chargeCORR., fragmentCORR. et type atomiqueCORR. correspondent respectivement à la charge partielle de l'atomeCORR. qui présente une correspondance avec un des atomes du ligand, à la molécule paramétrée dans CHARMM22 dans laquelle se trouve cet atome CORR. et au type de cet atome^a. Les valeurs de charge dérivées de l'analyse de population de Mulliken sont également indiquées. Les atomes dont les charges partielles ont été paramétrées sont indiqués par des astérisques.

atome de 8	type atomique	charge dans CHARMM22	charge HF	chargeCORR.	fragmentCORR.	type atomiqueCORR.
C1*	C	0,84	0,83	0,63	PRES CT1	CD
O1*	OS	-0,48	-0,65	-0,34/-0,5	PRES CT1	OS
O2*	OCO	-0,52	-0,57	-0,52/-0,5	PRES CT1	OB
C2*	CR1	0,11	-0,11	0,02	PRO	CP2
H*	HB	0,05	0,28	0,09	PRO	HB
C3*	CR2	-0,18	-0,31	-0,18/-0,19	PRO/CYCL	CP2/CT
H1*	HA	0,09	0,21	0,09/0,095	PRO/CYCL	HA/HA
H2*	HA	0,09	0,18	0,09/0,095	PRO/CYCL	HA/HA
C4*	CR2	-0,18	-0,34	-0,18/-0,19	PRO/CYCL	CP2/CT
H3*	HA	0,09	0,17	0,09/0,095	PRO/CYCL	HA/HA
H4*	HA	0,09	0,18	0,09/0,095	PRO/CYCL	HA/HA
C5*	CR2	-0,20	-0,32	-0,18/-0,19	PRO/CYCL	CP2/CT
H5*	HA	0,10	0,17	0,09/0,095	PRO/CYCL	HA/HA
H6*	HA	0,10	0,19	0,09/0,095	PRO/CYCL	HA/HA
C6*	CR3	-0,09	-0,13	0,00	PRO	CP3
H7*	HA	0,105	0,19	0,09	PRO	HA
H8*	HA	0,105	0,21	0,09	PRO	HA
N7*	NR	-0,37	-0,69	-0,47/-0,29	CROT/PRO	N
C8*	C	0,45	0,77	0,51	CROT	C
O3*	O	-0,46	-0,62	-0,51	CROT	O
C9*	C	0,44	0,46	-0,51	ILE	C
O4*	O	-0,40	-0,52	-0,51	ILE	O
C10*	CT0	-0,03	-0,13	-0,09	LEU/ILE	CT1
C11	CT2	-0,20	-0,33	-0,18	LEU/ILE	CT2
H9	HA	0,09	0,17	0,09	LEU/ILE	HA
H10	HA	0,09	0,20	0,09	LEU/ILE	HA
C12	CT3	-0,27	-0,50	-0,27	LEU/ILE	CT3
H11	HA	0,09	0,17	0,09	LEU/ILE	HA
H12	HA	0,09	0,17	0,09	LEU/ILE	HA
H13	HA	0,09	0,16	0,09	LEU/ILE	HA
C13	CT3	-0,27	-0,49	-0,27	LEU/ILE	CT3
H14	HA	0,09	0,22	0,09	LEU/ILE	HA
H15	HA	0,09	0,16	0,09	LEU/ILE	HA
H16	HA	0,09	0,17	0,09	LEU/ILE	HA
C14	CT3	-0,27	-0,47	-0,27	LEU/ILE	CT3
H17	HA	0,09	0,19	0,09	LEU/ILE	HA
H18	HA	0,09	0,16	0,09	LEU/ILE	HA
H19	HA	0,09	0,17	0,09	LEU/ILE	HA
C15*	COS	0,26	0,11	-0,14	PRES CT1	CT3
H20*	HA	0,01	0,22	0,09*3	PRES CT1	HA
C16	CT2	-0,18	-0,32	-0,18	LEU/ILE	CT2
H21	HA	0,09	0,18	0,09	LEU/ILE	HA
H22	HA	0,09	0,19	0,09	LEU/ILE	HA
C17	CT2P	-0,18	-0,36	-0,18	LEU/ILE	CT2
H23	HA	0,09	0,17	0,09	LEU/ILE	HA
H24	HA	0,09	0,19	0,09	LEU/ILE	HA
C18	C6R	0,00	0,04	0,00	PHE	CA
C19	C6R	-0,115	-0,23	-0,115	PHE	CA
H25	HA	0,115	0,20	0,115	PHE	HP
C20	C6R	-0,115	-0,19	-0,115	PHE	CA
H26	HA	0,115	0,20	0,115	PHE	HP
C21	C6R	-0,115	-0,21	-0,115	PHE	CA
H27	HA	0,115	0,20	0,115	PHE	HP
C22	C6R	-0,115	-0,19	-0,115	PHE	CA
H28	HA	0,115	0,20	0,115	PHE	HP
C23	C6R	-0,115	-0,22	-0,115	PHE	CA
H29	HA	0,115	0,20	0,115	PHE	HP
C24	C6R	0,00	0,02	0,00	PHE	CA
C25	C6R	-0,115	-0,23	-0,115	PHE	CA
H30	HA	0,115	0,21	0,115	PHE	HP
C26	C6R	-0,115	-0,20	-0,115	PHE	CA
H31	HA	0,115	0,21	0,115	PHE	HP
C27	C6R	-0,115	-0,20	-0,115	PHE	CA
H32	HA	0,115	0,21	0,115	PHE	HP
C28	C6R	-0,115	-0,20	-0,115	PHE	CA
H33	HA	0,115	0,21	0,115	PHE	HP
C29	C6R	-0,115	-0,21	-0,115	PHE	CA
H34	HA	0,115	0,22	0,115	PHE	HP

ANNEXES

atome de 308	type atomique	charge dans CHARMM22	charge HF	charge CORR.	fragment CORR.	type atomique CORR.
C30	COO	0,63	0,828	0,630	ETAC	CL
O2	OCO	-0,52	-0,608	-0,520	ETAC	OBL
O3	OS	-0,34	-0,625	-0,340	ETAC	OSL
C31	COS2	-0,05	-0,011	-0,050	ETAC	CTL2
H30	HA	0,09	0,183	0,090	ETAC	HAL
H31	HA	0,09	0,185	0,090	ETAC	HAL
C32	CT3	-0,27	-0,500	-0,270	ETAC	CTL3
H32	HA	0,09	0,172	0,090	ETAC	HAL
H33	HA	0,09	0,180	0,090	ETAC	HAL
H34	HA	0,09	0,183	0,090	ETAC	HAL
C26	CT3	-0,27	-0,478	-0,270	LEU	CT3
H60	HA	0,09	0,166	0,090	LEU	HA
H61	HA	0,09	0,157	0,090	LEU	HA
H62	HA	0,09	0,169	0,090	LEU	HA
C25	CT3	-0,27	-0,504	-0,270	LEU	CT3
H50	HA	0,09	0,161	0,090	LEU	HA
H51	HA	0,09	0,172	0,090	LEU	HA
H52	HA	0,09	0,155	0,090	LEU	HA
C24	CT2	-0,09	-0,163	-0,090	LEU	CT2
H24	HA	0,09	0,172	0,090	LEU	HA
C16	CT2	-0,18	-0,324	-0,180	LEU	CT2
H16	HA	0,09	0,180	0,090	LEU	HA
H17	HA	0,09	0,212	0,090	LEU	HA
C15	CT1	0,09	-0,038	0,07	liaison peptidique	CT1
H15	HB	0,07	0,243	0,09	liaison peptidique	HB
C1	C	0,51	0,801	0,510	liaison peptidique	C
O1	OF	-0,51	-0,626	-0,510	liaison peptidique	O
N1	NF1	-0,47	-0,835	-0,470	liaison peptidique	NH1
H11	H	0,31	0,441	0,310	liaison peptidique	H
C2*	CR1	0,09	-0,083	0,020	PRO	CP1
H1*	HB	0,08	0,286	0,090	PRO	HB
C3*	CR2	-0,18	-0,490	-0,180	PRO	CP2
H2*	HA	0,08	0,249	0,090	PRO	HA
H3*	HA	0,16	0,220	0,090	PRO	HA
S4*	ST	-0,12	0,128	-0,090	MET	S
C5*	CR2	-0,20	-0,490	-0,180	PRO	CP2
H4*	HA	0,14	0,238	0,090	PRO	HA
H5*	HA	0,14	0,202	0,090	PRO	HA
C6*	CR2	0,02	-0,145	0,000	PRO	CP3
H6*	HA	0,10	0,213	0,090	PRO	HA
H7*	HA	0,08	0,206	0,090	PRO	HA
N7*	NT	-0,61	-0,839	-0,290	PRO	NP
S8*	SO2	1,70	1,708	1,330	MSO4	SL
O4*	O2L	-0,60	-0,689	-0,650	MSO4	O2L
O5*	O2L	-0,58	-0,694	-0,650	MSO4	O2L
C17*	C6R	-0,20	-0,345	0,000	PHE	CA
C18*	C6RT	-0,03	-0,165	-0,115	PHE	CA
H18*	HP	0,03	0,264	0,115	PHE	HP
C19	C6R	-0,12	-0,236	-0,115	PHE	CA
H19	HP	0,12	0,212	0,115	PHE	HP
C20	C6R	0,00	0,058	0,000	PHE	CA
C21	C6R	-0,12	-0,225	-0,115	PHE	CA
H21	HP	0,12	0,222	0,115	PHE	HP
C22*	C6R	-0,03	-0,160	-0,115	PHE	CA
H22*	HP	0,03	0,259	0,115	PHE	HP
C23	CT3	-0,27	-0,513	-0,270	Toluene	CT3
H20	HA	0,09	0,186	0,090	Toluene	HA
H23	HA	0,09	0,190	0,090	Toluene	HA
H25	HA	0,09	0,181	0,090	Toluene	HA

TABLEAU A.3 – Tableau des charges partielles atomiques obtenues par une analyse de population de Mulliken après optimisation par la méthode MP2/6-31G* des cycles Ph1 et Tol respectivement des ligands **8** et **308**. Les valeurs indiquées par une étoile sont celles qui diffèrent de manière significative pour les deux cycles.

atome de 308	charge de l'atome de 8	atome équivalent dans 308	charge de l'atome de 308	différences
C18	0,02	C17	-0,32	0,34*
C19	-0,23	C18	-0,17	0,06
H25	0,19	H18	0,26	0,07
C20	-0,18	C19	-0,2	0,02
H26	0,2	H19	0,22	0,02
C21	-0,2	C20	-0,17	0,03
H27	0,2	H20	0,22	0,02
C22	-0,19	C21	-0,2	0,01
H28	0,2	H21	0,22	0,02
C23	-0,22	C22	-0,16	0,06*
H29	0,2	H22	0,25	0,05*

ANNEXES

TABLEAU A.4 – Paramètres du champ de force CHARMM22 définis pour les liaisons covalentes formées entre les atomes de **8** et entre les atomes de **308** accompagnés des correspondances. Les paramètres tirés de la LPDB pour le ligand **8** sont indiqués par un astérisque.

liaisons de 8	K _r	r ₀	distance de référence	liaisonCORR.	K _r CORR.	r ₀ CORR.
C8-C9*	282,00	1,515	1,541		282	1,515
C9-C10	250,00	1,490	1,533	C-C ^α	250	1,490
C1-C2	250,00	1,490	1,527	C-C ^α (PRO)	250	1,490
C8-N7	360,00	1,300	1,348	C-N	260	1,300
H1/H2-C3 H3/H4-C4	309,00	1,111	1,090	H-C ^β (PRO)	309	1,111
H5/H6-C5						
H7/H8-C6	309,00	1,111	1,080	H-C ^δ (PRO)	309	1,111
H-C2	330,00	1,080	1,080	H-C ^α (PRO)	330	1,080
N7-C2	320,00	1,434	1,458	C ^α -N (PRO)	320	1,434
N7-C6	320,00	1,455	1,463	C ^δ -N (PRO)	320	1,455
C3-C2	222,50	1,527	1,536	C ^β -C ^α (PRO)	222,5	1,527
C3/C5-C4	222,50	1,537	1,531	C ^β -C ^γ (PRO)	222,5	1,537
C6-C5	222,50	1,537	1,527	C ^δ -C ^γ (PRO)	222,5	1,537
C8-O3 C9-O4	620,00	1,230	1,198	C-O	620	1,230
C1-O2	620,00	1,230	1,191	C-O	620	1,230
C1-O1	150,00	1,334	1,319	C-OT2 (PRES CT1)	150	1,334
C18-C19/C23 C20-	305,00	1,375	1,387	C ^δ -C ^ε (PHE)	305	1,375
C19/C21 C22-C21/C23						
C24-C25/C29 C26-						
C25/C27 C28-C27/C29						
C24-C15	230,00	1,490	1,513	C ^γ -C ^β (PHE)	230	1,490
C16-C15	222,50	1,538	1,529	C ^β -C ^α	222,5	1,538
C11-C10	222,50	1,538	1,545	C ^β -C ^α	222,5	1,538
C13/C14-C10	222,50	1,538	1,541	C ^β -C ^γ ² (ILE)	222,5	1,538
C15-O1	340,00	1,430	1,440	CT-OT2 (PRES CT1)	340	1,430
H25-C19 H26-C20 H27-	340,00	1,080	1,080	H-C ^δ (PHE)	340	1,080
C21 H28-C22 H29-C23						
H30-C25 H31-C26 H32-						
C27 H33-C28 H34-C29						
H20-C15	309,00	1,111	1,080	H-C ^α	309	1,111
H23/H24-C17	309,00	1,111	1,059	H-C ^β	309	1,111
C17-C16	222,50	1,530	1,535	C ^β -C ^γ (LEU)	222,5	1,530
C18-C17	230,00	1,490	1,515	C ^γ -C ^β (PHE)	230	1,490

liaisons de 308	K _r	r ₀	distance de référence	fragmentCORR.	K _r CORR.	r ₀ CORR.
C15-C30	200	1,5179	1,5179	Ethylacetate	200,00	1,522
O2-C30	750	1,1929	1,1929	Ethylacetate	750,00	1,220
O3-C30	150	1,3151	1,3151	Ethylacetate	150,00	1,334
C31-O3	340	1,4285	1,4285	Ethylacetate	340,00	1,430
C31-C32	222,5	1,5138	1,5138	Ethylacetate	222,50	1,528
C31-H30/H31	309	1,0812	1,0812	Ethylacetate	309,00	1,111
N1-C1	370	1,3456	1,3456	liaison peptidique	370	1,345
N1-C15	320	1,4455	1,4455	squelette	320	1,430
C1-C2	250	1,5327	1,5327	PRO	250	1,490
O1-C1	620	1,2020	1,2020	squelette	620	1,230
N1-H11	440	0,9940	0,9940	squelette	440	0,997
C3-C2	222,50	1,5300	1,5300	PRO	222,500	1,527
H1-C2	330,00	1,0811	1,0811	PRO	330,000	1,080
N7-C2	320,00	1,4701	1,4701	PRO	320,000	1,434
C5-C6	222,50	1,5232	1,5232	PRO	222,500	1,537
H4/H5-C5 H6/H7-C6	309,00	1,0817	1,0817	PRO	309,000	1,111
N7-C6	320,00	1,4726	1,4726	PRO	320,000	1,455
C3/C5-S4	229,63	1,8128	1,8128	Cyclohexane	229,63	1,531
S8-N7	250,00	1,6588	1,6588	Methylsulfate	250	1,575
S8-O4/O5	540,00	1,4330	1,4330	Methylsulfate	540	1,448
C17-S8	250,00	1,7663	1,7663	Methylsulfate	250	1,575
C17/C21-C22 C20/C22-	305,00	1,3900	1,3900	PHE	305,00	1,375
C21 C19/C21-C20						
C20-C19						
C17/C19-C18	305,00	1,3900	1,3900	PHE	305,00	1,375
C23-C20	230,00	1,5094	1,5094	toluene	230,00	1,490
H19-C19 H21-C21 H22-	340,00	1,0700	1,0700	PHE	340,00	1,080
C22						
H18-C18	340,00	1,0700	1,0700	PHE	340,00	1,080

ANNEXES

TABLEAU A.5 – Paramètres du champ de force CHARMM22 définis pour les angles de valence de **8** et **308** accompagnés des correspondances. Les angles pour lesquels les paramètres ont été copiés sur ceux trouvés dans la LPDB sont indiqués par un astérisque. Pour **308**, les angles en gras correspondent à ceux qui ont été paramétrés.

angle de valence de 8	K Θ	Θ_0	K UB	UB_0	fragmentCORR.	K Θ	Θ_0 CORR.	K UB CORR.	UB_0 CORR.
H9/H10-C11-C10	33,43	108,00	22,53	2,179	ILE	33,43	110,1	22,53	2,1790
H14/H15/H16-C13-C10	33,43	110,70	22,53	2,179	LEU	33,43	110,1	22,53	2,1790
H17/H18/H19-C14-C10									
C12-C11-C10	58,35	116,10	11,16	2,561	ILE	58,35	113,5	11,16	2,5610
C13-C10-C14	58,35	108,40	8,00	2,561	LEU	53,35	114	8	2,5610
C13/C14-C10-C11	58,35	110,10	8,00	2,561	ILE	53,35	114	8	2,5610
C9-C10-C11	52,00	112,30			LEU	52	108		
C9-C10-C13/C14	52,00	107,90			ILE	52	108		
C8-C9-C10*	44,00	120,00				44	118		
C9-C8-N7*	65,00	119,30				65	120		
C8-C9-O4* C9-C8-O3*	80,00	117,00				80	120		
C10-C9-O4*	80,00	122,10	20,00	2,442	squelette PRES CT1	80 70	121 125	20	2,442
N7-C8-O3*	98,00	123,70				98	125,1		
C6-N7-C2*	80,00	115,00				80	120,5		
C5-C4-C3	70,00	111,00			PRO	70	108,5		
C4-C3-C2	70,00	111,90			PRO	70	108,5		
C6-C5-C4	70,00	110,60			PRO	70	108,5		
H2/H1-C3-C2	33,43	108,30	22,53	2,179	PRO	33,43	110,1	22,53	2,1790
H2/H1-C3-C4 H4/H3-C4	26,50	110,10	22,53	2,179	PRO	26,5	110,1	22,53	2,1790
C3/C5 H5/H6-C5-C4									
H5/H6-C5-C6	26,50	108,90	22,53	2,179	PRO	26,5	110,1	22,53	2,1790
H1-C3-H2 H3-C4-H4 H6-	35,50	107,30	5,40	1,802	PRO	35,5	109	5,4	1,8020
C5-H5									
H7/H8-C6-C5	26,50	110,50	22,53	2,179	PRO	26,5	110,1	22,53	2,1790
H7-C6-H8	35,50	107,20	5,40	1,802	PRO	35,5	109	5,4	1,8020
H-C2-C3	35,00	109,30			PRO	35	118		
N7-C2-H	48,00	107,20			PRO	48	112		
N7-C6-H7/H8	48,00	108,80			PRO	48	108		
C8-N7-C6	60,00	126,40			PRO	60	117		
C8-N7-C2	60,00	117,80			PRO	60	117		
C2-C1-O2	80,00	121,60	20,00	2,442	PRO PRES CT1	80 70	121 125	20	2,442
C2-C1-O1	55,00	114,40	20,00	2,326	PRO+PRES CT1	55	109	20	2,3260
O2-C1-O1	90,00	123,90	160,00	2,258	PRES CT1	90	125,9	160	2,2576
C1-C2-C3	52,00	111,40			C-Calpha-Cbeta	52	108		
C1-C2-N7	50,00	114,30			PRO	50	108,2		
C5-C6-N7	70,00	110,80			PRO	70	110,5		
C3-C2-N7	70,00	109,80			PRO	70	110,8		
H-C2-C1*	42,00	104,50				42	109		
C1-O1-C15	40,00	118,00	30,00	2,265	PRES CT1	40	109,6	30	2,2651
C18-C19-C20	40,00	120,00	35,00	2,258	PHE	40,00	120,00	35,00	2,258
C20-C21 C20-C21-C22									
C21-C22-C23 C22-									
C23-C18 C23-C18-C19									
C24-C25-C26 C25-C26-									
C27 C26-C27-C28 C27-									
C28-C29 C28-C29-C24									
C29-C24-C25									
H25-C19-C18/C20	30,00	120,00	22,00	2,153	PHE	30,00	120,00	22,00	2,153
H26-C20-C19/C21									
H27-C21-C20/C22									
H28-C22-C21/C23									
H29-C23-C22/C18									
H30-C25-C24/C26									
H31-C26-C25/C27									
H32-C27-C26/C28									
H33-C28-C27/C29 H34-									
C29-C28/C24									
C25/C29-C24-C15	45,80	120,50			PHE	45,8	122,3		
C25-C15-C16	51,80	114,60			PHE	51,8	107,5		
C24-C15-O1	51,80	107,40			PHE	51,8	107,5		
C16-C15-O1	51,80	108,50			PHE	51,8	107,5		
H20-C15-C24	49,30	109,20			PHE	49,3	107,5		
H21/H22-C16-C15	26,50	108,70	22,53	2,179	LYS	26,5	110,1	22,53	2,179
H20-C15-C16	26,50	109,30	22,53	2,179	LYS	26,5	110,1	22,53	2,179
H20-C15-O1*	59,0	107,60				59	108,25		
C17-C16-C15	58,35	113,10	11,16	2,561	LYS	58,35	113,5	11,16	2,561
C18-C17-C16	51,80	112,20			PHE	51,8	107,5		

ANNEXES

angle de valence de 8	K Θ	Θ_0	K_{UB}	UB_0	fragmentCORR.	K Θ	Θ_0 CORR.	K_{UB} CORR.	UB_0 CORR.
H23/H24-C17-C16	26,50	110,10	22,53	2,179	LYS	26,50	110,10	22,53	2,179
H21/H22-C16-C17	26,50	110,10	22,53	2,179	LYS	26,50	110,10	22,53	2,179
C19/C23-C18-C17	45,80	122,30			PHE	45,8	122,3		
H23-C17-H24	35,50	109,00	5,40	1,802	PHE	35,50	109,00	5,40	1,802
H23/H24-C17-C18	49,30	107,50			PHE	49,3	107,5		

angle de valence de 308	K Θ	Θ_0	K_{UB}	UB_0	fragmentCORR.	K Θ	Θ_0 CORR.	K_{UB} CORR.	UB_0 CORR.
H32/H33/H34-C32-C31	34,60	110,43	22,53	2,18	Ethylacetate	34,6	110,1	22,530	2,18
C30-O3-C31	40,00	117,94	30,00	2,27	Ethylacetate	40	109,6	30,000	2,27
H31/H30-C31-C32	34,60	111,87	22,53	2,18	Ethylacetate	34,6	110,1	22,530	2,18
H31-C31-H30	35,50	108,19	5,40	1,80	Ethylacetate	35,5	109	5,400	1,8
O2-C30-C15	70,00	124,60	20,00	2,44	Ethylacetate	70	125	20,000	2,44
O3-C30-O2	90,00	123,77	160,00	2,26	Ethylacetate	90	125,9	160,000	2,26
O3-C30-C15	55,00	111,61	20,00	2,33	Ethylacetate	55	109	20,000	2,33
O3-C31-C32	75,70	107,35			Ethylacetate	75,7	110,1		
H31/H30-C31-O3	60,00	108,75			Ethylacetate	60	109,5		
C16-C15-C30	52,00	114,65			Ethylacetate	52	108		
H15-C15-C30	33,00	105,58	30,00	2,16	Ethylacetate	33	109,5	30,000	2,16
H1-C2-C1	50,00	103,86			PRO	50	112		
N1-C15-C30	50,00	108,19			squelette	50	107		
H11-N1-C1	34,00	118,98			squelette	34	123		
C15-N1-C1	50,00	121,10			squelette	50,000	120		
H11-N1-C15	35,00	117,99			squelette	35,000	117		
N1-C15-H15	48,00	108,08			squelette	48,000	108		
N1-C15-C16	70,00	113,72			LEU	70	113,5		
N1-C1-C2	80,00	117,06			PRO	80	116,5		
C2-C1-O1	80,00	119,67			PRO	80	118		
O1-C1-N1	80,00	123,10			squelette	80	122,5		
C3-S4-C5	58,35	116,96	11,16	2,56					
H2/H3-C3-S4 H4/H5-C5-	33,43	108,35	22,53	2,18	CYCLOHEXANE	33,43	110,100	22,53	2,18
S4									
C6-C5-S4	58,35	111,13	11,16	2,56	CYCLOHEXANE	58,35	113,500	11,16	2,56
C2-C3-S4	58,35	113,48	11,16	2,56	CYCLOHEXANE	58,35	113,500	11,16	2,56
C2-N7-S8	60,00	117,69			PRO	60	117		
C6-N7-S8	60,00	116,01			PRO	60	117		
C1-C2-C3	52,00	111,82			PRO	52	112,3		
C1-C2-N7	50,00	112,86			PRO	50	108,2		
H3/H4-C3-C2	33,43	109,11	22,53	2,15	PRO	33,43	110,100	22,53	2,18
C6-N7-C2	100,00	117,49			PRO	100	114,2		
C3-C2-N7	70,00	113,54			PRO	70	110,8		
C5-C6-N7	70,00	114,16			PRO	70	110,5		
H3-C3-H4 H5-C5-H6 H7-	35,50	108,18	5,40	1,75	PRO	35,5	109,000	5,4	1,8
C6-H8									
N7-C6-H7/H8	48,00	107,70			PRO	48	108		
H1-C2-C3	35,00	107,37			PRO	35	118		
N7-C2-H1	48,00	106,61			PRO	48	112		
H5/H6-C5-C6 H7/H8-C6-	26,50	109,93	22,53	2,15	PRO	26,5	110,100	22,53	2,18
C5									
N7-S8-C17	70,00	103,50							
O4-S8-O5	130,00	119,47	35,00	2,45	Methylsulfate	130	109,470	35	2,45
O4/O5-S8-N7	85,00	108,14			Methylsulfate	85	98		
O4/O5-S8-C17	85,00	108,31			Methylsulfate	85	98		
S8-C17-C22	45,80	120,00			PHE	45,8	122,3		
S8-C17-C18	45,80	120,00			PHE	45,8	122,3		
C17-C22-C21 C22-C21-	40,00	120,00	35,00	2,42	PHE	40	120,000	35	2,42
C20 C21-C20-C19									
C20-C19-C18 C22-C17-	40,00	120,00	35,00	2,42	PHE	40	120,000	35	2,42
C18									
C17-C18-C19	40,00	120,00	35,00	2,42	PHE	40	120,000	35	2,42
C23-C20-C19/C21	45,80	120,67			toluene	45,8	122,3		
H20/H23/H25-C23-C20	49,30	111,03			toluene	49,3	107,5		
H19-C19-C20 H21-	30,00	120,00	22,00	2,15	PHE	30	120,000	22	2,15
C21-C20/C22 H22-C22-									
C17/C21									
H19-C19-C18	30,00	120,00	22,00	2,15	PHE	30	120,000	22	2,15
H18-C18-C17/C19	30,00	120,00	22,00	2,15	PHE	30	120,000	22	2,15

ANNEXES

TABLEAU A.6 – Paramètres du champ de force CHARMM22 définis pour les angles dièdres de 8 et 308.

angles dièdres de 8	K Φ	n	δ	fragment CORR.	AD CORR.				K Φ CORR.	n CORR.
O2-C1-O1-C15	0,9651,0	180	PRES CT1	OB	CD	OS	CT3	0,965	1	
O2-C1-O1-C15	3,8502,0	180	PRES CT1	OB	CD	OS	CT3	3,850	2	
C2-C1-O1-C15	2,0502,0	180	PRES CT1	X	CD	OS	X	2,050	2	
C3-C2-N7-C6	0,3143,0	10,6	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
H-C2-N7-C6	0,0003,0	10,6	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
C1-C2-N7-C6	0,1573,0	10,6	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
C1-C2-N7-C8	0,1573,0	180	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
C3-C2-N7-C8	0,3143,0	180	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
H-C2-N7-C8	0,0003,0	180	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
N7-C2-C3-C4	0,4713,0	339,2	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
N7-C2-C3-H1/H2	0,0003,0	339,2	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
C1-C2-C3-C4	0,4713,0	339,2	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
C1-C2-C3-H1/H2	0,0003,0	339,2	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
H-C2-C3-C4	0,4713,0	339,2	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
H-C2-C3-H1/H2	0,0003,0	339,2	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
C2-C3-C4-C5	1,4133,0	21,7	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
H1/H2-C3-C4-C5 H5/H6	0,0003,0	21,7	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
C5-C4-C3										
C2-C3-C4-H3/H4	0,0003,0	21,7	CYCLOHEXANE					0,157	3	
C6-C5-C4-C3	1,4133,0	338,6	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
C6-C5-C4-H3/4	0,0003,0	338,6	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
H1/H2-C3-C4-H3/H4	0,0003,0	338,6	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
H3/H4-C4-C5-H5/H6										
N7-C6-C5-C4	1,4133,0	17,2	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
H7/H8-C6-C5-C4	0,0003,0	17,2	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
N7-C6-C5-H5/H6	0,0003,0	17,2	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
H7/H8-C6-C5-H5/H6	0,0003,0	17,2	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
C5-C6-N7-C2	0,4713,0	295,7	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
H7/H8-C6-N7-C2	0,0003,0	295,7	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
C5-C6-N7-C8	0,4713,0	295,7	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
H7/H8-C6-N7-C8	0,0003,0	295,7	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3	
H25-C19-C20-H26	2,4002,0	180	PHE	HP	CA	CA	HP	2,400	2	
H26-C20-C21-H27 H27-										
C21-C22-H28 H28-C22-										
C23-H29 H30-C25-C26-										
H31 H31-C26-C27-H32										
H32-C27-C28-H33 H33-										
C28-C29-H34										
C18-C19-C20-H26 C19-	4,2002,0	180	PHE	HP	CA	CA	CA	4,200	2,0	
C20-C21-H27 C20-C21-										
C22-H28 C21-C22-C23-										
H29 C23-C18-C19-H25										
C24-C25-C26-H31 C25-										
C26-C27-H32 C26-C27-										
C28-H33 C27-C28-C29-										
H34 C29-C24-C25-H30										
C18-C19-C20-C21 C19-	3,1002,0	180	PHE	CA	CA	CA	CA	3,100	2	
C20-C21-C22 C20-C21-										
C22-C23 C21-C22-C23-										
C18 C22-C23-C18-C19										
C23-C18-C19-C20 C24-										
C25-C26-C27 C25-C26-										
C27-C28 C26-C27-C28-										
C29 C27-C28-C29-C24										
C28-C29-C24-C25 C29-										
C24-C25-C26										
C15-C24-C25-C26 C15-	3,1002,0	180	PHE	CT2	CA	CA	CA	3,100	2	
C24-C29-C28										

ANNEXES

angles dièdres de 8	K Φ	n	δ	fragment CORR.	AD CORR.				K Φ CORR.	n CORR.
C15-C24-C25-H30	C15-4,200	2,0	180	PHE	HP	CA	CA	CT2	4,200	2
C24-C29-H34										
C17-C18-C19-C20	C17-3,100	2,0	180	PHE	CT2	CA	CA	CA	3,100	2
C18-C23-C22										
C17-C18-C19-H25	C17-4,200	2,0	180	PHE	HP	CA	CA	CT2	4,200	2
C18-C23-H29										
C9-C10-C13-	0,200	3,0	0	ILE	X	CT1	CT3	X	0,200	3
H14/H15/H16	C9-C10-									
C14-H17/H18/H19										
C9-C10-C11-C12	C9-0,200	3,0	0	ILE	X	CT1	CT2	X	0,200	3
C10-C11-H9/H10										

angle dièdre de 308	K Φ	n	δ	fragment CORR.	AD CORR.				K Φ CORR.	n CORR.
O2-C30-O3-C31	3,850	2	180	Ethylacétate	OBL	CL	OSL	CTL2	3,850	2
O2-C30-O3-C31	0,965	1	180	Ethylacétate	OBL	CL	OSL	CTL2	0,965	1
C15-C30-O3-C31	2,050	2	180	Ethylacétate	X	CL	OSL	X	2,050	2
O3-C31-C32-H30/H31	0,160	3	0	Ethylacétate	X	CTL2	CTL3	X	0,160	3
C2-C1-N1-H11	2,500	2	180	Liaison peptidique	H	NH1	C	CP1	2,500	2
H11-N1-C1-O1	2,500	2	180	Liaison peptidique	O	C	NH1	H	2,500	2
C2-C1-N1-C15	1,600	1	0	Liaison peptidique	CT1	C	NH1	CT1	1,600	1
C2-C1-N1-C15	2,500	2	180	Liaison peptidique	CT1	C	NH1	CT1	2,500	2
C15-N1-C1-O1	2,500	2	180	Liaison peptidique	O	C	NH1	CT1	2,500	2
C3-C2-N7-C6	0,100	3	0	PRO	CP3	N	CP1	CP2	0,100	3
C3-C2-N7-S8	0,800	3	0	PRO	CP2	CP1	N	C	0,800	3
H1-C2-N7-C6	0,100	3	0	PRO	HB	CP1	N	CP3	0,100	3
H1-C2-N7-S8	0,800	3	0	PRO	HB	CP1	N	C	0,800	3
C1-C2-N7-C6	0,100	3	0	PRO	CP3	N	CP1	C	0,100	3
C1-C2-N7-S8	0,800	3	0	PRO	C	N	CP1	C	0,800	3
N7-C2-C3-S4	0,157	3	0	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3
N7-C2-C3-H2/H3	0,157	3	0	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3
C1-C2-C3-S4	0,157	3	0	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3
C1-C2-C3-H2/H3	0,157	3	0	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3
H1-C2-C3-S4	0,157	3	0	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3
H1-C2-C3-H2/H3	0,157	3	0	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3
H4/H5-C5-C6-H6/H7	0,157	3	0	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3
N7-C6-C5-S4	0,157	3	0	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3
H6/H7-C6-C5-S4	0,157	3	0	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3
N7-C6-C5-H4/H5	0,157	3	0	CYCLOHEXANE	X	CT	CT	X	0,157	3
C5-C6-N7-C2	0,100	3	0	PRO	CP2	CP3	N	CP1	0,100	3
H6/H7-C6-N7-C2	0,100	3	0	PRO	HA	CP3	N	CP1	0,100	3
C5-C6-N7-S8	0,000	3	180	PRO	CP2	CP3	N	C	0,000	3
H6/H7-C6-N7-S8	0,000	3	180	PRO	HA	CP3	N	C	0,000	3
S8-C17-C22-C21	3,100	2	180	PHE	CT2	CA	CA	CA	3,100	2
S8-C17-C18-C19	3,100	2	180	PHE	CT2	CA	CA	CA	3,100	2
C19-C20-C21-C22	C20-3,100	2	180	PHE	CA	CA	CA	CA	3,100	2
C21-C22-C17										
C21-C20-C19-C18	C21-3,100	2	180	PHE	CA	CA	CA	CA	3,100	2
C22-C17-C18										
C20-C19-C18-C17	C22-3,100	2	180	PHE	CA	CA	CA	CA	3,100	2
C17-C18-C19										
C23-C20-C21-C22	3,100	2	180	Toluène	CT3	CA	CA	CA	3,100	2
C23-C20-C19-C18	3,100	2	180	Toluène	CT3	CA	CA	CA	3,100	2
H19-C19-C20-C21	4,200	2	180	PHE	HP	CA	CA	CA	4,200	2
H21-C21-C22-C17										
H21-C21-C20-C19	H22-									
C22-C21-C20										
H22-C22-C17-C18	4,200	2	180	PHE	HP	CA	CA	CA	4,200	2
H19-C19-C18-C17	4,200	2	180	PHE	HP	CA	CA	CA	4,200	2
H18-C18-C19-C20	H18-4,200	2	180	PHE	HP	CA	CA	CA	4,200	2
C18-C17-C22										
H19-C19-C20-C23	H21-4,200	2	180	Toluène	HP	CA	CA	CT3	4,200	2
C21-C20-C23										
H20/H23/H25-C23-C20-	0,000	6	0	Toluène	X	CT3	CA	X	0,000	6
C19/C21										
H22-C22-C17-S8	4,200	2	180	PHE	HP	CA	CA	CT2	4,200	2
H18-C18-C17-S8	4,200	2	180	PHE	HP	CA	CA	CT2	4,200	2
H21-C21-C22-H22	2,400	2	180	PHE	HP	CA	CA	HP	2,400	2
H18-C18-C19-H19	2,400	2	180	PHE	HP	CA	CA	HP	2,400	2

TABLEAU A.7 – Paramètres du champ de force CHARMM22 définis pour les angles dièdres de **8** et **308**.

angle impropre	K_{imp}	ϕ_0	fragmentCORR.	AI CORR.	K_ϕ CORR.	ϕ_0 CORR.
C9 O4 C8 C10	120	0,000	Liaison peptidique	C X X O	120	0,000
C8 O3 N7 C9	120	0,000	Liaison peptidique	C X X O	120	0,000
C1 O1 O2 C2	120	0,000	Liaison peptidique	C X X O	120	0,000
N7 C2 C8 C6	4	0,000	ASN/GLN	NH2 X X H	4	0,000

angle impropre	K_{imp}	π_0	fragmentCORR.	AI CORR.	K_ϕ CORR.	ϕ_0 CORR.
C30 C15 O3 O2	100	0	Ethylacétate	OBL X X CL	100	0
C1 C2 N1 O1	120	-2,4	Liaison peptidique	O X X C	120	0
N1 C1 C15 H11	20	8,3	Liaison peptidique	NH1 X X H	20	0
N7 S8 C2 C6	0	-19,2	PRO	N C CP1 CP3	0	0

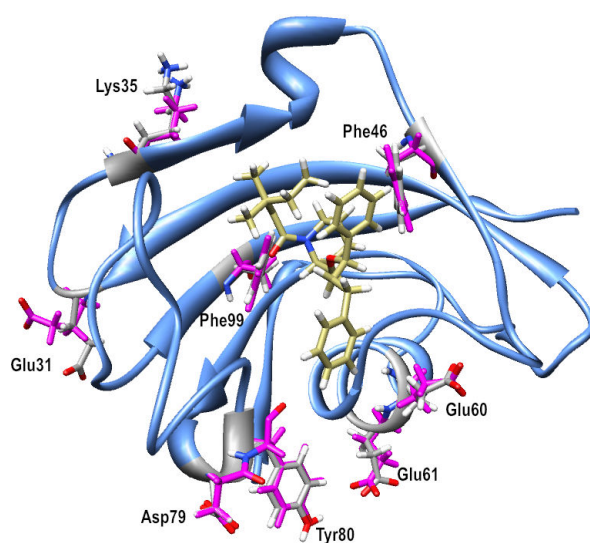


FIGURE A.1 – Positions des chaînes latérales des résidus de FKBP12 dans SC1 avant (gris) et après modifications (fushia). Les structures secondaires de FKBP12 (en bleu) ainsi que le ligand **8** (en doré) sont représentés afin d’observer les positions relatives des résidus dont les positions des chaînes latérales ont été modifiées.

TABLEAU A.8 – Liste des liaisons hydrogènes formées entre des atomes du squelette de la protéine FKBP12 avec les distances de contact mesurées sur les structures cristallographiques des deux complexes. Deux lettres sont utilisées afin de définir la conservation de la liaison hydrogène pour les différents états : C et T correspondent à une liaison hydrogène respectivement conservée et transitoire. Ces descriptions correspondent à des fréquences de contact dans l'état complexé comprises respectivement dans les intervalles [66 ; 100] et [0 ; 66%].

Numéro	Liaison hydrogène de l'ensemble LHSC	SC1		SC2		EC1		EC2	
		distance de contact (Å)	angle $O \cdots H - N$ (°)	distance de contact (Å)	angle $O \cdots H - N$ (°)	LD1	SBD1	LD2	SBD2
1	^p Gly1-O... ^p Ser77-H	1,99	175,8	1,97	167,4	C	C	C	T
2	^a Gln3-H... ^l Thr75-O	2,01	146,4	1,99	163,8	C	C	C	T
3	^a Gln3-O... ^l Thr75-H	1,97	150,0	1,94	159,0	C	C	C	T
4	^a Glu5-H... ^l Lys73-O	1,92	159,2	1,98	154,2	C	C	C	C
5	^a Glu5-O... ^l Lys73-H	1,73	160,6	1,75	174,0	C	C	C	C
6	^a Ile7-H... ^l Arg71-O	1,76	159,2	1,76	157,3	C	C	C	C
7	^a Ser8-H... ^l Arg71-O	1,97	157,3	2,04	160,8	C	C	C	T
8	^a Ser8-O... ^l Arg71-H	1,86	170,7	2,01	162,2	C	C	C	T
9	^b Asp11-H... ^k Val68-O	2,07	132,3	1,85	156,5	C	T	C	T
10	^b Thr14-O... ^k Val68-H	2,06	142,4	2,12	143,6	T	C	T	T
11	^b Lys17-O... ^b Gln20-H	2,04	164,1	1,99	164,6	T	T	T	T
12	^b Gly19-H... ⁱ Leu50-O	1,84	173,4	1,82	145,3	C	C	C	C
13	^b Gln20-O... ⁱ Leu50-H	2,00	153,6	2,05	166,9	C	C	C	C
14	^c Thr21-O... ^p Glu107-H	1,84	164,1	1,98	161,3	C	C	C	C
15	^c Cys22-H... ^h Phe48-O	1,87	153,2	1,79	170,7	C	C	C	C
16	^c Cys22-O... ^h Phe48-H	2,18	152,7	2,17	153,4	C	C	C	C
17	^c Val23-O... ^o Leu104-H	1,99	151,5	1,92	145,9	C	C	C	C
18	^c Val23-H... ^o Lys105-O	2,06	151,8	2,02	163,4	C	C	C	C
19	^c Val24-H... ^h Phe46-O	1,97	169,4	1,85	167,7	C	C	C	C
20	^c Val24-O... ^h Phe46-H	1,89	156,4	1,94	156,2	C	C	C	C
21	^c His25-H... ^o Glu102-O	2,12	147,4	2,25	153,2	C	C	C	C
22	^c His25-O... ^o Glu102-H	1,96	161,0	1,95	160,7	C	C	C	C
23	^c Tyr26-O... ^f Ser39-H	2,10	137,4	2,21	137,2	C	C	C	T
24	^c Thr27-H... ^o Asp100-O	1,98	149,0	2,10	149,1	C	C	C	C
25	^c Thr27-O... ^o Asp100-H	1,88	170,8	2,01	160,5	C	C	C	C
26	^c Gly28-O... ^e Phe36-H	1,89	160,3	1,82	162,8	C	C	C	C

ANNEXES

Numéro	Liaison hydrogène de l'ensemble LHSC	SC1		SC2		EC1		EC2	
		distance de contact (Å)	angle $\widehat{O \cdots H - N}$ (°)	distance de contact (Å)	angle $\widehat{O \cdots H - N}$ (°)	LD1	SBD1	LD2	SBD2
27	^c Gly28-H... ^e Asp37-O	1,85	163,0	1,91	167,0	C	C	C	T
28	^c Met29-H... ^o Val98-O	1,78	169,9	1,74	157,7	C	C	C	C
29	^c Met29-O... ^o Val98-H	1,79	161,6	2,06	172,7	C	C	C	C
30	^c Leu30-O... ^d Gly33-H	1,97	164,9	1,96	158,9	C	T	C	T
31	^c Leu30-H... ^d Lys34-O	1,98	162,9	2,18	155,8	C	C	C	C
32	^e Ser38-O... ^{fg} Asp41-H	2,71*	131,6	2,33	144,7	T	T	T	T
33	^{fg} Ser39-O... ^{fg} Arg42-H	2,33	122,5	2,11	157,1	T	T	T	T
34	^{fg} Arg40-O... ^g Asn43-H	2,22	140,3	2,26	158,2	T	T	T	T
35	^h Met49-O... ⁱ Lys52-H	2,38	165,8	2,09	166,8	T	T	T	T
36	ⁱ Ile56-O... ^j Trp59-H	2,10	135,7	2,25	126,7	C	C	C	C
37	ⁱ Ile56-O... ^j Glu60-H	2,38	154,2	2,13	163,8	C	C	C	C
38	^j Arg57-O... ^j Glu61-H	2,18	162,9	2,01	162,3	C	C	C	C
39	^j Gly58-O... ^j Gly62-H	2,07	132,7	1,94	149,8	T	C	T	C
40	^j Gly58-H... ^m Tyr80-O	1,95	153,5	1,94	153,7	C	C	C	C
41	^j Trp59-O... ^j Val63-H	1,85	159,7	1,91	162,0	C	C	C	C
42	^j Gly62-O... ^k Gln65-H	2,14	146,0	2,35	149,4	T	T	T	T
43	^j Val63-O... ^k Met66-H	1,92	160,9	2,03	163,7	C	C	C	T
44	^k Ser67-O... ^k Gln70-H	2,12	153,3	2,01	152,9	C	C	C	T
45	^k Gly69-H... ^o Leu103-O	1,93	159,0	1,83	161,6	C	C	C	C
46	^k Gln70-O... ^o Leu103-H	1,88	156,0	1,95	148,0	C	C	C	T
47	^l Ala72-H... ^o Val101-O	1,90	165,7	1,88	157,6	C	C	C	C
48	^l Ala72-O... ^o Val101-H	1,90	174,1	1,79	169,7	C	C	C	C
49	^l Leu74-H... ^o Phe99-O	1,86	159,4	1,81	161,3	C	C	C	C
50	^l Leu74-O... ^o Phe99-H	1,97	163,2	1,97	162,8	C	C	C	C
51	^l Ile76-H... ^o Leu97-O	1,94	162,2	1,80	161,9	C	C	C	C
52	^l Ile76-O... ^o Leu97-H	2,04	154,6	2,00	154,8	C	C	T	C
53	^p Ser77-O... ^m Tyr80-H	1,90	152,5	2,04	148,0	C	C	C	C
54	^m Pro78-O... ^p Ala81-H	2,01	154,6	1,96	152,7	C	T	T	T
55	^m Pro78-O... ⁿ Gly83-H	1,93	144,4	1,79	154,4	C	T	T	T
56	ⁿ Tyr82-O... ⁿ Gly86-H	2,00	158,8	1,95	151,8	T	T	T	T
57	ⁿ Gly83-O... ⁿ His94-H	1,84	159,2	2,01	150,5	C	C	C	C

Numéro	Liaison hydrogène de l'ensemble LHSC	SC1		SC2		EC1		EC2	
		distance de contact (Å)	angle $\widehat{O \cdots H - N}$ (°)	distance de contact (Å)	angle $\widehat{O \cdots H - N}$ (°)	LD1	SBD1	LD2	SBD2
58	"His87-O... "Ile90-H	1,90	148,1	2,22	157,0	T	T	T	T
59	"His87-H... "Ile91-O	2,08	145,4	1,97	145,0	C	T	C	T
60	"His87-O... "Ile91-H	2,06	159,0	2,04	169,9	C	C	C	C

-
- a.* Ce résidu a été assigné par DSSP comme faisant partie du brin $\beta 1$
b. Ce résidu a été désigné comme faisant partie de la boucle 10
c. Ce résidu a été assigné par DSSP comme faisant partie du brin $\beta 4$
d. Ce résidu a été désigné comme faisant partie de la boucle 30
e. Ce résidu a été assigné par DSSP comme faisant partie du brin $\beta 5$
f. Ce résidu a été assigné par DSSP comme faisant partie de l'hélice h1
g. Ce résidu a été désigné comme faisant partie de la boucle 40
h. Ce résidu a été assigné par DSSP comme faisant partie du brin $\beta 6$
i. Ce résidu a été désigné comme faisant partie de la boucle 50
j. Ce résidu a été assigné par DSSP comme faisant partie de l'hélice α
k. Ce résidu a été désigné comme faisant partie de la boucle 60
l. Ce résidu a été assigné par DSSP comme faisant partie du brin $\beta 2$
m. Ce résidu a été assigné par DSSP comme faisant partie de l'hélice h2
n. Ce résidu a été désigné comme faisant partie de la boucle 80
o. Ce résidu a été assigné par DSSP comme faisant partie du brin $\beta 3$
p. Ce résidu n'a pas été assigné par DSSP, ni désigné dans cette étude ou une autre comme faisant partie d'une structure secondaire

*La distance de contact ne correspond pas au critère choisi pour définir une liaison hydrogène (valeur dépassant 2,4 Å).

Bibliographie

- [1] Wang, T. W. ; Donahoe, P. ; Zervos, A. S. Specific interaction of type-I receptors of the TGF- β family with the immunophilin FKBP-12. *Science* **265**, 674–676 (1994). (cité sur la page 1)
- [2] Brillantes, A. M. B. ; Ondrias, K. ; Scott, A. ; Kobrinsky, E. ; Ondriasova, E. ; Moschella, M. C. ; Jayaraman, T. ; Landers, M. ; Ehrlich, B. E. ; Marks, A. R. Stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* **77**, 513–523 (1994). (cité sur la page 1)
- [3] Cameron, A. M. ; Steiner, J. P. ; Roskams, A. J. ; Ali, S. M. ; Ronnett, G. V. ; Snyder, S. H. Calcineurin associated with the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca²⁺ flux. *Cell* **83**, 463–472 (1995). (cité sur la page 1)
- [4] DeCenzo, M. T. ; Park, S. T. ; Jarrett, B. P. ; Aldape, R. A. ; Futer, O. ; Murcko, M. A. ; Livingston, D. J. FK506-binding protein mutational analysis : defining the active-site residue contributions to catalysis and the stability of ligand complexes. *Prot. Eng.* **9**, 173–180 (1996). (2 citations sur les pages 1 et 187)
- [5] Wullschleger, S. ; Loewith, R. ; Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471–484 (2006). (cité sur la page 1)
- [6] Jiang, B. H. and Liu, L. Z. Role of mTOR in anticancer drug resistance : perspectives for improved drug treatment. *Drug Resist. Updates* **11**, 63–76 (2008). (cité sur la page 1)
- [7] Bierer, B. E. ; Mattila, P. S. ; Standaert, R. F. ; Herzenberg, L. A. ; Burakoff, S. J. ; Crabtree, G. R. ; Schreiber, S. L. Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 9231–9235 (1990). (cité sur la page 1)

- [8] Liu, J. ; Farmer, J. D. ; Friedman, J. ; Weissman, I. ; Schreiber, S. L. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807–815 (1991). (cité sur la page 2)
- [9] Fung, J. J. and Starzl, T. E. FK506 in solid organ transplantation. *Ther. Drug Monit.* **17**, 592–595 (1995). (cité sur la page 2)
- [10] Danovitch, G. M. Choice of immunosuppressive drugs and individualization of immunosuppressive therapy for kidney transplant patients. *Transplant. Proc.* **31**, 2–6 (1999). (cité sur la page 2)
- [11] Herdegen, T. ; Fischer, G. ; Gold, B. G. Immunophilin ligands as a novel treatment for neurological disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 3–5 (2000). (cité sur la page 2)
- [12] Davies, T. H. and Sánchez, E. R. FKBP52. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 42–47 (2005). (cité sur la page 2)
- [13] Bierer, B. E. ; Mattila, P. S. ; Standaert, R. F. ; Herzenberg, L. A. ; Burakoff, S. J. ; Crabtree, G. ; Schreiber, S. L. Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 9231–9235 (1990). (cité sur la page 2)
- [14] Banaszynski, L. A. ; Liu, C. W. ; Wandless, T. J. Characterization of the FKBP.Rapamycin.FRB ternary complex. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4715–4721 (2005). (cité sur la page 2)
- [15] Sun, F. ; Li, P. ; Ding, Y. ; Wang, L. ; Bartlam, M. ; Shu, C. ; Shen, B. ; Jiang, H. ; Li, S. ; Rao, Z. Design and structure-based study of new potential FKBP12 inhibitors. *Biophys. J.* **85**, 3194–3201 (2003). (3 citations sur les pages 2, 186 et 189)
- [16] Zhang, C. ; Chen, J. ; DeLisi, C. Protein-protein recognition : exploring the energy funnels near the binding sites. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **34**, 255–267 (1999). (cité sur la page 5)
- [17] Holt, D. ; Luengo, J. ; Yamashita, D. ; Oh, H. ; Konialian, A. ; Yen, H. ; Rozamus, L. ; Brandt, M. ; Bossard, M. ; Levy, M. A. ; Eggleston, D. S. ; Liang, J. ; Schultz, L. W. ; Stout, T. J. ; Clardy, J. Design, synthesis, and kinetic evaluation of high-affinity FKBP

- ligands and the X-ray crystal structures of their complexes with FKBP12. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 9925–9938 (1993). (8 citations sur les pages 5, 6, 7, 92, 96, 183, 185 et 186)
- [18] Berman, H. ; Westbrook, J. ; Feng, Z. ; Gilliland, G. ; Bhat, T. ; Weissig, H. ; Shindyalov, I. ; Bourne, P. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000). (cité sur la page 5)
- [19] Babine, R. E. and Bender, S. L. Molecular recognition of protein-ligand complexes : applications to drug design. *Chem. Rev.* **97**, 1359–1472 (1997). (4 citations sur les pages 5, 6, 183 et 187)
- [20] Lamb, M. L. and Jorgensen, W. L. Investigations of neurotrophic inhibitors of FK506 binding protein via Monte Carlo Simulations. *J. Med. Chem.* **41**, 3928–3939 (1998). (2 citations sur les pages 6 et 7)
- [21] Wang, J. ; Deng, Y. ; Roux, B. Absolute binding free energy calculations using molecular dynamics simulations with restraining potentials. *Biophys. J.* **91**, 2798–2814 (2006). (cité sur la page 6)
- [22] Xu, Y. and Wang, R. A computational analysis of the binding affinities of FKBP12 inhibitors using the MM-PB/SA method. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **64**, 1058–1068 (2006). (cité sur la page 6)
- [23] Yang, W. ; Rozamus, L. W. ; Narula, S. ; Rollins, C. T. ; Yuan, R. ; Andrade, L. J. ; Ram, M. K. ; Phillips, T. B. ; van Schravendijk, M. R. ; Dalgarno, D. ; Clackson, T. ; Holt, D. A. Investigating protein-ligand interactions with a mutant FKBP possessing a designed specificity pocket. *J. Med. Chem.* **43**, 1135–1142 (2000). (4 citations sur les pages 6, 7, 184 et 189)
- [24] Sun, F. ; Li, P. ; Ding, Y. ; Wang, L. ; Bartlam, M. ; Shu, C. ; Shen, B. ; Jiang, H. ; Li, S. ; Rao, Z. Design and structure-based study of new potential FKBP12 inhibitors. *Biophys. J.* **85**, 3194–3201 (2003). (cité sur la page 7)
- [25] Zhao, L. ; Liu, H. ; Wang, L. ; Li, S. Modeling and synthesis of non-cyclic derivatives of GPI-1046 as potential FKBP ligands with neurotrophic properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 4385–4390 (2006). (3 citations sur les pages 7, 186 et 189)

- [26] Lapelosa, M. ; Gallicchio, E. ; Levy, R. M. Conformational transitions and convergence of absolute binding free energy calculations. *J. Chem. Theory and Comput.* **8**, 47–60 (2012). (2 citations sur les pages 8 et 9)
- [27] Zacharias, M. Rapid protein ligand docking using soft modes from molecular dynamics simulations to account for protein. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **54**, 759–767 (2004). (2 citations sur les pages 9 et 180)
- [28] Ivery, M. T. G. and Weiler, L. Modeling the interaction between FK506 and FKBP12 : a mechanism for formation of the calcineurin inhibitory complex. *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 217–232 (1997). (6 citations sur les pages 9, 92, 101, 111, 139 et 181)
- [29] Michnick, S. W. ; Rosen, M. K. ; Wandless, T. J. ; Karplus, M. ; Schreiber, S. L. Solution structure of FKBP, a rotamase enzyme and receptor for FK506 and rapamycin. *Science* **252**, 836–839 (1991). (2 citations sur les pages 9 et 101)
- [30] Rosen, M. K. and Schreiber, S. L. Natural products as probes of cellular function : studies of immunophilins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **31**, 384–400 (1992). (2 citations sur les pages 9 et 181)
- [31] Mittag, T. ; Schaffhausen, B. ; Günther, U. L. Tracing kinetic intermediates during ligand binding. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9017–9023 (2004). (cité sur la page 10)
- [32] Selzer, T. ; Albeck, S. ; Schreiber, G. Rational design of faster associating and tighter binding protein complexes. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 537–541 (2000). (cité sur la page 10)
- [33] Lemons, D. S. and Gythiel, A. Paul Langevin’s 1908 paper ‘On the Theory of Brownian Motion’. *Am. J. Phys.* **65**, 1079–1081 (1997). (3 citations sur les pages 11, 19 et 74)
- [34] Lazaridis, T. and Karplus, M. Effective energy function for proteins in solution. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **35**, 133–152 (1999). (3 citations sur les pages 11, 19 et 74)
- [35] Brünger, A. ; Brooks III, C. L. ; Karplus, M. Stochastic boundary conditions for molecular dynamics simulations of ST2 water. *Chem. Phys. Lett.* **105**, 495–500 (1984). (3 citations sur les pages 11, 21 et 74)
- [36] Paci, E. and Karplus, M. Forced unfolding of fibronectin type 3 modules : an analysis by biased molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.* **288**, 441–459 (1999). (2 citations sur les pages 11 et 22)

- [37] Paci, E. ; Caffisch, A. ; Plückthun, A. ; Karplus, M. Forces and energetics of hapten-antibody dissociation : a biased molecular dynamics simulation study. *J. Mol. Biol.* **314**, 589–605 (2001). (4 citations sur les pages 11, 12, 22 et 121)
- [38] Olivieri, L. and Gardebien, F. Molecular dynamics simulations of a binding intermediate between FKBP12 and a high-affinity ligand. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 725–741 (2011). (7 citations sur les pages 12, 86, 119, 136, 169, 173 et 182)
- [39] Newton, I. *Mathematical Principles of Natural Philosophy*, (1729). (2 citations sur les pages 13 et 19)
- [40] Leach, A. R. *Molecular Modelling : Principles and Applications (2nd Edition)*. Prentice Hall, (2001). (5 citations sur les pages 13, 14, 17, 19 et 28)
- [41] Brooks, B. R. ; Brooks III, C. L. ; MacKerell Jr., A. D. ; Nilsson, L. ; Petrella, R. J. ; Roux, B. ; Won, Y. ; Archontis, G. ; Bartels, C. ; Boresch, S. ; Caffisch, A. ; Caves, L. ; Cui, Q. ; Dinner, A. R. ; Feig, M. ; Fischer, S. ; Gao, J. ; Hodosscek, M. ; Im, W. ; Kuczera, K. ; Lazaridis, T. ; Ma, J. ; Ovchinnikov, V. ; Paci, E. ; Pastor, R. W. ; Post, C. B. ; Pu, J. Z. ; Schaefer, M. ; Tidor, B. ; Venable, R. M. ; Woodcock, H. L. ; Wu, X. ; Yang, W. ; York, D. M. ; Karplus, M. CHARMM : The biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* **30**, 1545–1614 (2009). (3 citations sur les pages 14, 18 et 21)
- [42] Urey, H. C. and Bradley, C. A. The vibrational of pentatomic tetrahedral molecules. *Phys. Rev.* **38**, 1969–1978 (1931). (cité sur la page 14)
- [43] MacKerell, A. ; Bashford, D. ; Bellott, M. ; Dunbrack Jr., R. L. ; Evanseck, J. D. ; Field, M. J. ; Fischer, S. ; Gao, J. ; Guo, H. ; Ha, S. ; Joseph-McCarty, D. ; Kuchnir, L. ; Kuczera, K. ; Lau, F. T. K. ; Mattos, C. ; Michnick, S. ; Ngo, T. ; Nguyen, D. T. ; Prodhom, B. ; Reiher III, W. E. ; Roux, B. ; Schlenkerich, M. ; Smith, J. C. ; Stote, R. ; Straub, J. ; Watanabe, M. ; Wiórkiewicz-Kuczera, J. ; Yin, D. ; Karplus, M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586–3616 (1998). (cité sur la page 14)
- [44] Coulomb, C.-A. *Premier mémoire sur l'électricité et le magnétisme*. Prentice Hall, (1785). (cité sur la page 16)
- [45] Pauli, W. Nobel Lectures, Physics, Exclusion Principle and Quantum Mechanics, Dec. 13, 1946. In *Nobel Lectures*, (1946). (cité sur la page 17)

- [46] Guvench, O. and MacKerell, A. D. Jr. Comparison of protein force fields for molecular dynamics simulations. In *Methods in Molecular Biology*, Walker, J. M. and Kukol, A., editor, 63–88. Humana Press, Totowa, NJ (2008). (cité sur la page 17)
- [47] Lorentz, H. A. Ueber die Anwendung des Satzes vom Virial in der kinetischen Theorie der Gase. *Annalen der Physik* **248**, 127–136 (1881). (cité sur la page 17)
- [48] Sutmann, G. Classical molecular dynamics. In *Quantum Simulations of Complex Many-Body Systems : From Theory to Algorithms. Lecture Notes*, Grotendorst, J. ; Marx, D. ; Muramatsu, A., editors, 211–254. NIC Series Volume 10 (2002). (cité sur la page 17)
- [49] Hockney, R. The potential calculation and some applications. *Meth. Comp. Phys.* **9**, 136–211 (1970). (cité sur la page 18)
- [50] Ryckaert, J. ; Ciccotti, G. ; Berendsen, H. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints : molecular dynamics of n-alkanes. *J. comput. Phys* **23**, 327–341 (1977). (cité sur la page 18)
- [51] Fan, H. ; Mark, A. E. ; Zhu, J. ; Honig, B. Comparative study of generalized Born models : protein dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6760–6764 (2005). (cité sur la page 19)
- [52] Kubo, R. The fluctuation-dissipation theorem. *Rep. Prog. Phys.* **29**, 255–284 (1966). (cité sur la page 19)
- [53] Brooks III, C. Deformable stochastic boundaries in molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* **79**, 6312–6325 (1983). (2 citations sur les pages 21 et 79)
- [54] Brünger, A. ; Brooks, C. L. ; Karplus, M. Molecular dynamics with stochastic boundaries : application to the active site of proteins in solution. In *Molecular Dynamics and Protein Structure, Proceedings of a Workshop*, 16–17. J. Hermans, University of North Carolina, (1985). (cité sur la page 21)
- [55] Brünger, A. T. ; Brooks, C. L. ; Karplus, M. Active site dynamics of ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 8458–8462 (1985). (cité sur la page 21)
- [56] Swegat, W. ; Schlitter, J. ; Krüger, P. ; Wollmer, A. MD simulation of protein-ligand interaction : formation and dissociation of an insulin-phenol complex. *Biophys. J.* **84**, 1493–1506 (2003). (2 citations sur les pages 22 et 119)

- [57] Curcio, R. ; Caffisch, A. ; Paci, E. Change of the unbinding mechanism upon a mutation : a molecular dynamics study of an antibody-hapten complex. *Protein Sci.* **14**, 2499–2514 (2005). (4 citations sur les pages 22, 121, 124 et 136)
- [58] Frisch, M. J. ; Trucks, G. W. ; Schlegel, H. B. ; Scuseria, G. E. ; Robb, M. A. ; Cheeseman, J. R. ; Montgomery Jr., J. A. ; Vreven, T. ; Kudin, K. N. ; Burant, J. C. ; Millam, J. M. ; Iyengar, S. S. ; Tomasi, J. ; Barone, V. ; Mennucci, B. ; Cossi, M. ; Scalmani, G. ; Rega, N. ; Petersson, G. A. ; Nakatsuji, H. ; Hada, M. ; Ehara, M. ; Toyota, K. ; Fukuda, R. ; Hasegawa, J. ; Ishida, M. ; Nakajima, T. ; Honda, Y. ; Kitao, O. ; Nakai, H. ; Klene, M. ; Li, X. ; Knox, J. E. ; Hratchian, H. P. ; Cross, J. B. ; Bakken, V. ; Adamo, C. ; Jaramillo, J. ; Gomperts, R. ; Stratmann, R. E. ; Yazyev, O. ; Austin, A. J. ; Cammi, R. ; Pomelli, C. ; Ochterski, J. W. ; Ayala, P. Y. ; Morokuma, K. ; Voth, G. A. ; Salvador, P. ; Dannenberg, J. J. ; Zakrzewski, V. G. ; Dapprich, S. ; Daniels, A. D. ; Strain, M. C. ; Farkas, O. ; Malick, D. K. ; Rabuck, A. D. ; Raghavachari, K. ; Foresman, J. B. ; Ortiz, J. V. ; Cui, Q. ; Baboul, A. G. ; Clifford, S. ; Cioslowski, J. ; Stefanov, B. B. ; Liu, G. ; Liashenko, A. ; Piskorz, P. ; Komaromi, I. ; Martin, R. L. ; Fox, D. J. ; Keith, T. ; Al-Laham, M. A. ; Peng, C. Y. ; Nanayakkara, A. ; Challacombe, M. ; Gill, P. M. W. ; Johnson, B. ; Chen, W. ; Wong, M. W. ; Gonzalez, C. ; Pople, J. A. *Gaussian03*. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, (2004). (cité sur la page 23)
- [59] Schmidt, M. W. ; Baldridge, K. K. ; Boatz, J. A. ; Elbert, S. T. ; Gordon, M. S. ; Jensen, J. H. ; Koseki, S. ; Matsunaga, N. ; Nguyen, K. A. ; Su, S. ; Windus, T. L. ; Dupuis, M. ; Montgomery, J. A. General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comput. Chem.* **14**, 1347–1363 (1993). (cité sur la page 23)
- [60] Schaftenaar, G. and Noordik, J. H. Molden : a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures. *J. Computer-aided mol. design* **14**, 123–134 (2000). (cité sur la page 23)
- [61] Stewart, J. J. P. *MOPAC2006. Version 1.0, Fujitsu Limited, Tokyo, Japan.* (2006). (3 citations sur les pages 23, 169 et 173)
- [62] Klamt, A. and Schüürmann, G. COSMO : a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **220**, 799–805 (1993). (cité sur la page 23)

- [63] Pranata, J. and Jorgensen, W. L. Computational studies on FK506 : conformational search and molecular dynamics simulation in water. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9483–9493 (1991). (cité sur la page 24)
- [64] Zoete, V. ; Cuendet, M. A. ; Grosdidier, A. ; Michielin, O. SwissParam : a fast force field generation tool for small organic molecules. *J. Comput. Chem.* **32**, 2359–2368 (2011). (cité sur la page 24)
- [65] Amaro, R. ; Dhaliwal, B. ; Luthey-Schulten, Z. *Parameterizing a novel residue*. <http://www-s.ks.uiuc.edu/Training/TutorialsOverview/science/forcefield-tutorial/>, (2007). (3 citations sur les pages 27, 29 et 34)
- [66] Mulliken, R. Electronic Population Analysis on LCAO-MO Molecular Wave Functions. *J. Chem. Phys.* **23**, 1833–1840 (1955). (2 citations sur les pages 28 et 48)
- [67] MacKerell, A. D. Jr. Atomistic models and force fields. In *Computational Biochemistry and Biophysics*, chapter 2, 7–38. CRC Press (2001). (5 citations sur les pages 28, 29, 30, 35 et 48)
- [68] Ostlund, A. S. . N. *Modern Quantum Chemistry : Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. Dover Publications, Inc., New York, (1996). (cité sur la page 28)
- [69] Davidson, E. R. and Feller, D. Basis set selection for molecular calculations. *Chem. Rev.* **86**, 681–696 (1986). (cité sur la page 28)
- [70] Reiher, W. *Theoretical studies of hydrogen bonding*. PhD thesis, Harvard University, (1985). (cité sur la page 29)
- [71] Jorgensen, W. L. Theoretical studies of medium effects on conformational equilibria. *J. Phys. Chem.* **87**, 5304–5314 (1983). (cité sur la page 29)
- [72] Jorgensen, W. ; Chandrasekhar, J. ; Madura, J. ; Impey, R. ; Klein, M. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935 (1983). (2 citations sur les pages 30 et 82)
- [73] Vanommeslaeghe, K. ; Hatcher, E. ; Acharya, C. ; Kundu, S. ; Zhong, S. ; Shim, J. ; Darian, E. ; Guvench, O. ; Lopes, P. ; Vorobyov, I. ; Mackerell, A. CHARMM general force field : a force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom ad-

- ditive biological force fields. *J. Comput. Chem.* **31**, 671–690 (2010). (4 citations sur les pages 30, 32, 34 et 48)
- [74] MacKerell, A. ; Wiorkiewicz-Kuczera, J. ; Karplus, M. An all-atom empirical energy function for the simulation of nucleic-acids. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 11946–11975 (1995). (cité sur la page 30)
- [75] Feller, S. ; Yin, D. ; Pastor, R. ; MacKerell, A. Molecular dynamics simulation of unsaturated lipid bilayers at low hydration : parameterization and comparison with diffraction studies. *Biophys. J.* **73**, 2269–2279 (1997). (cité sur la page 32)
- [76] Chen, I. J. ; Yin, D. ; Mackerell, A. Combined ab initio/empirical approach for optimization of Lennard-Jones parameters for polar-neutral compounds. *J. Comput. Chem.* **23**, 199–213 (2001). (cité sur la page 32)
- [77] Sundius, T. Molvib - A flexible program for force field calculations. *J. Mol. Struct.* **218**, 321–326 (1990). (cité sur la page 33)
- [78] Roche, O. ; Kiyama, R. ; Brooks, C. L. Ligand-Protein DataBase : linking protein-ligand complex structures to binding data. *J. Med. Chem.* **44**, 3592–3598 (2001). (2 citations sur les pages 35 et 39)
- [79] Foloppe, N. and MacKerell, A. D. Jr. All-atom empirical force field for nucleic acids : I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *J. Comput. Chem.* **21**, 86–104 (2000). (cité sur la page 35)
- [80] Sarzyńska, J. and Kuliński, T. Parametrization of 2-thiouracil and 4-thiouracil in CHARMM all-atom empirical force field. *Computational Methods in Science and Technology* **11**, 49–55 (2005). (2 citations sur les pages 48 et 54)
- [81] Bren, U. ; Hodoscek, M. ; Koller, J. Development and validation of empirical force field parameters for netropsin. *J. Chem. Inf. Model.* **45**, 1546–1552 (2005). (cité sur la page 48)
- [82] MacKerell, A. ; Bashford, D. ; Bellott, M. ; Dunbrack, R. L. ; Evanseck, J. ; Field, M. ; Fischer, S. ; Gao, J. ; Guo, H. ; Ha, S. ; Joseph-McCarthy, D. ; Kuchnir, L. ; Kuczera, K. ; Lau, F. ; Mattos, C. ; Michnick, S. ; Ngo, T. ; Nguyen, D. ; Prodhom, B. ; Reiher, W. ; Roux, B. ; Schlenkrich, M. ; Smith, J. ; Stote, R. ; Straub, J. ; Watanabe, M. ; Wiorkiewicz-

- Kuczera, J. ; Yin, D. ; Karplus, M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586–3616 (1998). (cité sur la page 48)
- [83] Brooks, B. R. ; Bruccoleri, R. ; Olafson, B. ; States, D. J. ; Swaminathan, S. ; Karplus, M. CHARMM : A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **4**, 187–217 (1983). (cité sur la page 49)
- [84] Levy, R. M. and Gallicchio, E. Computer simulations with explicit solvent : recent progress in the thermodynamic decomposition of free energies and in modeling electrostatic effects. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **49**, 531–567 (1998). (cité sur la page 74)
- [85] Davis, A. M. ; St-Gallay, S. A. ; Kleywegt, G. J. Limitations and lessons in the use of X-ray structural information in drug design. *Drug Discovery Today* **13**, 831–841 (2008). (cité sur la page 74)
- [86] Pettersen, E. F. ; Goddard, T. D. ; Huang, C. C. ; Couch, G. S. ; Greenblatt, D. M. ; Meng, E. C. ; Ferrin, T. E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004). (cité sur la page 75)
- [87] Vriend, G. WHAT IF : a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* **8**, 52–56 (1990). (cité sur la page 75)
- [88] Dunbrack, R. L. Rotamer libraries in the 21st century. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 431–440 (2002). (cité sur la page 75)
- [89] Van Duyne, G. D. ; Standaert, R. F. ; Karplus, P. A. ; Schreiber, S. L. ; Clardy, J. Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J. Mol. Biol.* **229**, 105–124 (1993). (6 citations sur les pages 80, 81, 92, 97, 101 et 111)
- [90] Szep, S. ; Park, S. ; Boder, E. T. ; Van Duyne, G. D. ; Saven, J. G. Structural coupling between FKBP12 and buried water. *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **74**, 603–611 (2009). (cité sur la page 81)
- [91] Mark, P. and Nilsson, L. Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K. *J. Phys. Chem. A* **105**, 9954–9960 (2001). (cité sur la page 82)

- [92] Caves, L. S. ; Evanseck, J. D. ; Karplus, M. Locally accessible conformations of proteins : multiple molecular dynamics simulations of crambin. *Protein Sci.* **7**, 649–666 (1998). (2 citations sur les pages 89 et 98)
- [93] Kabsch, W. and Sander, C. Dictionary of protein secondary structure : pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577–2637 (1983). (cité sur la page 92)
- [94] Sapienza, P. J. ; Mauldin, R. V. ; Lee, A. L. Multi-timescale dynamics study of FKBP12 along the rapamycin-mTOR binding coordinate. *J. Mol. Biol.* **405**, 378–394 (2011). (3 citations sur les pages 92, 101 et 111)
- [95] Brath, U. and Akke, M. Differential responses of the backbone and side-chain conformational dynamics in FKBP12 upon binding the transition-state analog FK506 : implications for transition-state stabilization and target protein recognition. *J. Mol. Biol.* **387**, 233–244 (2009). (3 citations sur les pages 92, 101 et 111)
- [96] Michnick, S. ; Rosen, M. ; Wandless, T. ; Karplus, M. ; Schreiber, S. Solution structure of FKBP, a rotamase enzyme and receptor for FK506 and Rapamycin. *Science* **252**, 836–839 (1991). (2 citations sur les pages 92 et 111)
- [97] Sich, C. ; Improta, S. ; Cowley, D. J. ; Guenet, C. ; Merly, J. P. ; Teufel, M. ; Saudek, V. Solution structure of a neurotrophic ligand bound to FKBP12 and its effects on protein dynamics. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5342–5355 (2000). (3 citations sur les pages 92, 101 et 111)
- [98] Nakanishi, I. ; Fedorov, D. G. ; Kitaura, K. Molecular recognition mechanism of FK506 binding protein : an all-electron fragment molecular orbital study. *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **68**, 145–158 (2007). (2 citations sur les pages 97 et 111)
- [99] Karplus, M. and McCammon, J. A. Dynamics of proteins : elements and function. *Biochemistry* **52**, 263–300 (1983). (cité sur la page 98)
- [100] Ringe, D. and Petsko, G. A. Mapping protein dynamics by X-ray diffraction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **45**, 197–235 (1985). (cité sur la page 98)
- [101] Eastman, P. ; Pellegrini, M. ; Doniach, S. Protein flexibility in solution and in crystals. *J. Chem. Phys.* **110**, 10141–10152 (1999). (cité sur la page 98)

- [102] Brooks, C. ; Karplus, M. ; Pettitt, B. *Advances in Chemical Physics, Proteins : a theoretical perspective of dynamics, structure, and thermodynamics*. Wiley-Interscience, (1990). (cité sur la page 99)
- [103] Rejto, P. A. ; Verkhivker, G. M. Mean field analysis of FKBP12 complexes with FK506 and rapamycin : implications for a role of crystallographic water molecules in molecular recognition and specificity. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **28**, 313–324 (1997). (cité sur la page 99)
- [104] Wilson, K. P. ; Yamashita, M. M. ; Sintchak, M. D. ; Rotstein, S. H. ; Murcko, M. A. ; Boger, J. ; Thomson, J. A. ; Fitzgibbon, M. J. ; Black, J. R. ; Navia, M. A. Comparative X-ray structures of the major binding protein for the immunosuppressant FK506 (tacrolimus) in unliganded form and in complex with FK506 and rapamycin. *Acta Cryst.* **D51**, 511–521 (1995). (3 citations sur les pages 99, 139 et 181)
- [105] Böhm, H. J. and Klebe, G. What can we learn from molecular recognition in protein-ligand complexes for the design of new drugs ? *Angew. Chem. Int. Ed.* **35**, 2588–2614 (1996). (cité sur la page 105)
- [106] Rhodes, G. *A User's Guide to Crystallographic Models*, chapter 8, 159–186. Academic Press An imprint of Elsevier Science, San Diego, California, 3 edition (2006). (cité sur la page 105)
- [107] Cornell, W. ; Abseher, R. ; Nilges, M. ; Case, D. A. Continuum solvent molecular dynamics study of flexibility in interleukin-8. *J. Mol. Graph. Model.* **19**, 136–145 (2001). (cité sur la page 112)
- [108] Paci, E. and Karplus, M. Unfolding proteins by external forces and temperature : the importance of topology and energetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6521–6526 (2000). (cité sur la page 121)
- [109] Huang, H. ; Ozkirimli, E. ; Post, C. B. A comparison of three perturbation molecular dynamics methods for modeling conformational transitions. *J. Chem. Theory Comput.* **5**, 1301–1314 (2009). (cité sur la page 121)
- [110] Huang, D. and Caffisch, A. The free energy landscape of small molecule unbinding. *PLoS Comput. Biol.* **7**, 1–12 (2011). (cité sur la page 122)

- [111] Li, A. and Daggett, V. Molecular dynamics simulation of the unfolding of barnase : characterization of the major intermediate. *J. Mol. Biol.* **275**, 677–694 (1998). (cité sur la page 127)
- [112] Shan, Y. ; Kim, E. T. ; Eastwood, M. P. ; Dror, R. O. ; Seeliger, M. A. ; Shaw, D. E. How does a drug molecule find its target binding site ? *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 9181–9183 (2011). (cité sur la page 133)
- [113] Paci, E. ; Caffisch, A. ; Plückthun, A. ; Karplus, M. Forces and energetics of hapten-antibody dissociation : a biased molecular dynamics simulation study. *J. Mol. Biol.* **314**, 589–605 (2001). (cité sur la page 136)
- [114] Peters, G. H. and Bywater, R. P. Computational analysis of chain flexibility and fluctuations in *Rhizomucor miehei* lipase. *Prot. Eng.* **12**, 747–754 (1999). (cité sur la page 138)
- [115] Teplyakov, A. ; Sebastiao, P. ; Obmolova, G. ; Perrakis, A. ; Brush, G. S. ; Bessman, M. J. ; Wilson, K. S. Crystal structure of bacteriophage T4 deoxynucleotide kinase with its substrates dGMP and ATP. *EMBO J.* **15**, 3487–3497 (1996). (cité sur la page 138)
- [116] Hornak, V. ; Okur, A. ; Rizzo, R. C. ; Simmerling, C. HIV-1 protease flaps spontaneously open and reclose in molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 915–920 (2006). (cité sur la page 138)
- [117] Burkhard, P. ; Taylor, P. ; Walkinshaw, M. D. X-ray structures of small ligand-FKBP complexes provide an estimate for hydrophobic interaction energies. *J. Mol. Biol.* **295**, 953–962 (2000). (cité sur la page 139)
- [118] Rosen, M. ; Yanf, D. ; Martin, P. ; Schreiber, S. Activation of an inactive immunophilin by mutagenesis. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 821–822 (1993). (cité sur la page 139)
- [119] Schreiber, G. ; Haran, G. ; Zhou, H.-X. Fundamental aspects of protein-protein association kinetics. *Chem. Rev.* **109**, 839–860 (2009). (cité sur la page 146)
- [120] Meyer, E. A. ; Castellano, R. K. ; Diederich, F. Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 1210–1250 (2003). (cité sur la page 166)

- [121] Nikitina, E. ; Sulimov, V. ; Zayets, V. ; Zaitseva, N. Semiempirical calculations of binding enthalpy for protein-ligand complexes. *Int. J. Quant. Chem.* **97**, 747–763 (2004). (cité sur la page 169)
- [122] Chang, C. A. ; McLaughlin, W. A. ; Baron, R. ; Wang, W. ; McCammon, J. A. Entropic contributions and the influence of the hydrophobic environment in promiscuous protein-protein association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7456–7461 (2008). (2 citations sur les pages 178 et 192)
- [123] Dobbins, S. E. ; Lesk, V. I. ; Sternberg, M. J. E. Insights into protein flexibility : the relationship between normal modes and conformational change upon protein-protein docking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10390–10395 (2008). (cité sur la page 181)
- [124] Lepre, C. A. ; Pearlman, D. A. ; Cheng, J. W. ; DeCenzo, M. T. ; Moore, J. M. ; Livingston, D. J. Solution structure of FK506 bound to the R42K, H87V double mutant of FKBP-12. *Biochemistry* **33**, 13571–13580 (1994). (cité sur la page 183)
- [125] Hamilton, G. S. ; Huang, W. ; Connolly, M. A. ; Ross, D. T. ; Guo, H. ; Valentine, H. L. ; Suzdak, P. D. ; Steiner, J. P. FKBP12-binding domain analogues of FK506 are potent, nonimmunosuppressive neurotrophic agents in vitro and promote recovery in a mouse model of parkinson's disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 1785–1790 (1997). (cité sur la page 183)
- [126] Koser, P. L. ; Eng, W. K. ; Bossard, M. J. ; McLaughlin, M. M. ; Cafferkey, R. ; Sathe, G. M. ; Faucette, L. ; Levy, M. A. ; Johnson, R. K. ; Bergsma, D. J. ; Livi, G. P. The tyrosine89 residue of yeast FKBP12 is required for rapamycin binding. *Gene* **129**, 159–165 (1993). (cité sur la page 187)
- [127] Ikura, T. and Ito, N. Requirements for peptidyl-prolyl isomerization activity : a comprehensive mutational analysis of the substrate-binding cavity of FK506-binding protein 12. *Protein Sci.* **16**, 2618–2625 (2007). (cité sur la page 188)
- [128] Koide, S. and Sidhu, S. S. The importance of being tyrosine : lessons in molecular recognition from minimalist synthetic binding proteins. *ACS Chem. Biol.* **4**, 325–334 (2009). (cité sur la page 188)

- [129] Orozco, M. ; Tirado-Rives, J. ; Jorgensen, W. L. Mechanism for the rotamase activity of FK506 binding protein from molecular dynamics simulations. *Biochemistry* **32**, 12864–12874 (1993). (cité sur la page 189)
- [130] Fattori, D. Molecular recognition : the fragment approach in lead generation. *Drug Discov. Today* **9**, 229–238 (2004). (cité sur la page 193)
- [131] Ruddock, L. W. ; Freedman, R. B. ; Klappa, P. Specificity in substrate binding by protein folding catalysts : tyrosine and tryptophan residues are the recognition motifs for the binding of peptides to the pancreas-specific protein disulfide isomerase PDIp. *Protein Sci.* **9**, 758–764 (2000). (cité sur la page 193)
- [132] Huntley, J. J. A. ; Fast, W. ; Benkovic, S. J. ; Wright, P. E. ; Dyson, H. J. Role of a solvent-exposed tryptophan in the recognition and binding of antibiotic substrates for a metallo- β -lactamase. *Protein Sci.* **12**, 1368–1375 (2003). (cité sur la page 193)
- [133] Mian, I. S. ; Bradwell, A. R. ; Olson, A. J. Structure, function and properties of antibody binding sites. *J. Mol. Biol.* **217**, 133–151 (1991). (cité sur la page 193)

Résumé

FKBP12 est une protéine ubiquitaire, principalement cytosolique, qui est au carrefour de plusieurs voies signalétiques. Son abondance naturelle dans les tissus nerveux peut être reliée à son implication dans les maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson ainsi que dans les neuropathies périphériques et diabétiques ou dans des blessures des cordons spinaux. De nombreuses études ont montré que des molécules exogènes (ligands) venant se fixer sur cette protéine permettent la régénération d'un grand nombre de connexions neuronales endommagées. Une difficulté provient cependant du fait que, pour un ligand donné, il n'existe aucune relation claire entre sa structure et sa capacité de liaison à FKBP12. Notre étude vise ainsi à rationaliser la relation entre la structure d'un ligand et son affinité pour cette protéine. Deux complexes modèles, formés entre FKBP12 et chacun des deux ligands **8** et **308**, ont été utilisés. Ces deux ligands de haute affinité ont des structures différentes. Notre travail s'est appuyé sur des simulations de dynamique moléculaire pour caractériser l'état intermédiaire qui est formé transitoirement lors du processus de complexation entre la protéine et son ligand. Dans cet état particulier, l'identification des interactions naissantes entre les partenaires a permis (i) de comprendre l'implication des différentes parties du ligand dans le mécanisme de reconnaissance avec FKBP12 et (ii) de rationaliser les affinités de certains ligands apparentés.

Mots-clés

FKBP12, état intermédiaire de complexation, reconnaissance moléculaire, interactions protéine-ligand, simulations de dynamique moléculaire, ligand de haute affinité, paramétrisation d'un champ de force, calculs Hartree-Fock

Abstract

FKBP12 is an ubiquitous, mostly cytosolic, protein found at the crossroads of several signaling pathways. Its natural abundance in the nervous tissues can be related to its implication in neurodegenerative diseases like Alzheimer's and Parkinson's as well as in peripheral neuropathies and diabetes or in injuries of the spinal cords. Several studies have demonstrated that exogenous molecules (ligands) that can bind to FKBP12 allow the regeneration of many damaged neuron connections. However, there is no clear relationship between the structure of a ligand and its ability to bind to FKBP12. Our study aims at rationalizing the relationship between the structure of a ligand and its affinity to FKBP12. Two model complexes, formed between FKBP12 and each of the two high-affinity ligands **8** and **308**, were studied. These two ligands are structurally different. We used molecular dynamics simulations to characterize the intermediate state that is transiently formed during the binding process between the protein and its ligand. In this state, the analysis of the nascent interactions allowed (i) to unravel the role played by the various ligand moieties in the recognition process with FKBP12 and (ii) to rationalize the affinities of related ligands.

Keywords

FKBP12, binding intermediate state, molecular recognition, protein-ligand interactions, molecular dynamics simulations, high-affinity ligand, force field parameterization, Hartree-Fock calculations